

FRANCIELI SILVA VUOLO

**EFEITOS DO CANABIDIOL EM UM MODELO MURINO DE
ASMA ALÉRGICA FOCO NA INFLAMAÇÃO E NO PROCESSO
DE REMODELAMENTO**

Tese de Doutorado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências da Saúde para
obtenção do título de Doutor em
Ciências da Saúde. Orientador:
Felipe Dal-Pizzol.

**CRICIÚMA
2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

V994e Vuolo, Francieli Silva.

Efeitos do canabidiol em um modelo murino de asma alérgica foco na inflamação e no processo de remodelamento / Francieli Silva Vuolo ; orientador : Felipe Dal Pizzol. – Criciúma, SC : Ed. do Autor, 2016.

101 p. : il. ; 21 cm.

Tese (Doutorado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2016.

1. Canabidiol – Uso terapêutico. 2. Asma – Tratamento. 3. Vias aéreas (Medicina) – Inflamação – Tratamento. 4. Remodelação das vias aéreas. I. Título.

CDD 22. ed. 615.1

Bibliotecária Eliziane de Lucca Alosilla – CRB 14/1101
Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC

Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão

Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)

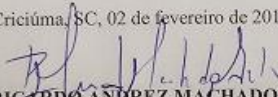
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005

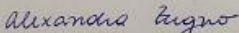
PARECER

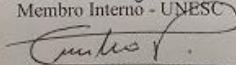
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Tese de DOUTORADO apresentada pela candidata **Francieli Silva Vuolo** sob o título **“Efeitos do canabidiol em um modelo murino de asma alérgica foca na inflamação e no processo de remodelamento”**, para obtenção do grau de **DOUTORA EM CIÊNCIAS DA SAÚDE** do Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

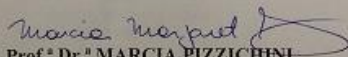
Após haver analisado o referido trabalho e arguido a candidata, os membros são de parecer pela **“APROVAÇÃO”** da Tese.

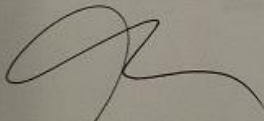
Criciúma, SC, 02 de fevereiro de 2016.

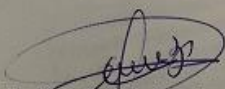

Prof. Dr. RICARDO ANDRÉZ MACHADO DE ÁVILA
Membro Relator - UNESC


Prof.ª Dr.ª ALEXANDRA IOPPI ZUGNO
Membro Interno - UNESC


Prof. Dr. EMÍLIO PIZZICHINI
Membro Externo - UFSC


Prof.ª Dr.ª MARCIA PIZZICHINI
Membro Externo - UFSC


Prof. Dr. Felipe Dal-Pizzol
Orientador


Prof. Dr. Claudio Teodoro de Souza
Coordenador do PPGCS

Agradecimentos

Um agradecimento especial às pessoas especiais, pois como dizem “a gratidão é virtude das almas nobres”

Agradeço primeiramente ao grande mestre e mentor *Felipe Dal Pizzol*, tive o prazer de ter sido sua aluna de mestrado e de continuar sob sua orientação em meu doutoramento. Nunca me perguntei se teria sido melhor mudar meu caminho, pois não tenho dúvidas que estive com um dos melhores, grande sábio cujas lições exploraram o ambiente acadêmico, agradeço profundamente o privilégio da boa convivência de vários anos, acima de tudo o exemplo científico e de caráter ser seguido, respeitado e admirado;

Agradeço a minha mãe *Susana*, e ao meu pai, *Francisco*, a estes minha eterna gratidão, que com total dedicação estiveram ao meu lado me encorajando nas horas difíceis e me aplaudindo nos momentos de glória;

À *Katriny* minha irmã, quem sempre me conforta com sua presença, minha eterna incentivadora, companheira e amiga;

À minha eterna amiga, e irmã de coração *Fabrícia*, que sempre me incentivou e me expirou;

À minha amiga *Silane* pelo encorajamento e apoio;

Aos meus colegas de pós-graduação, pelo encorajamento, companheirismo e experiências trocadas *Priscila, Andressa, Monique, Leandro, Volnei, Cleonice*;

Aos alunos de iniciação científica, *Mariane, Beatriz, Rafa, Henrique, Celso, Juliano, e Renata* que contribuem diariamente para formação de mestres e doutores;

Aos professores do *Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde* da UNESC, por partilharem seus conhecimentos;

Ao *Laboratório de Investigação Pulmonar* da Universidade Federal do Rio de Janeiro;

Agradecer a todos que ajudaram a construir este trabalho não é tarefa fácil. O maior perigo que se coloca para o agradecimento seletivo não é decidir quem incluir, mas decidir quem não mencionar. Então, a meus amigos que, de uma forma ou de outra, contribuíram com sua amizade e com sugestões efetivas para a realização deste trabalho, gostaria de expressar minha profunda gratidão.

RESUMO

A asma representa um problema de saúde pública, e tradicionalmente é classificada como uma doença atópica, onde o contato ao alérgeno pode desencadear sinais clínicos como inflamação das vias aéreas, hiperresponsividade brônquica e obstrução reversível do fluxo aéreo. Após a instalação do processo inflamatório característico da asma, ocorre a migração de células inflamatórias para o pulmão e vias aéreas. Estudos demonstram a presença de Linfócitos T auxiliar no pulmão de pacientes com asma, estas células estão envolvidas na produção de citocinas que regulam a síntese de imunoglobulinas como a IgE. Sabendo que a interação de células do sistema imune e contato com antígenos representam um ponto crucial na fisiopatologia de doenças inflamatórias, o propósito do presente estudo foi avaliar o potencial antiasmático do Canabidiol (CBD) neste cenário, por já ter sido relatado o seu papel como antiinflamatório, imunomodulador e antioxidante. Para tal, utilizamos dois modelos animais, camundongos Balb/c e ratos Wistar, ambos expostos a ovalbumina. Os animais foram avaliados quando a mecânica respiratória, níveis de citocinas, expressão de CB1, CB2, MMP-2 e MMP-9, no pulmão, lavado broncoalveolar e sangue. Os animais avaliados tratados com o CBD apresentaram grande diminuição no perfil inflamatório pulmonar quando comparados com os animais expostos ao modelo de asma, com a diminuição de citocinas (IL-4, IL-5, IL-13, eotaxina), mostraram também melhora quanto a elasticidade do pulmão quando diminuíram a elastância estática pulmonar dos animais que receberam o tratamento, confirmando tal potencial com a diminuição de células polimorfonucleares e da hiperresponsividade das vias aéreas, reforçando estudos que também apresentam com esse papel anti-inflamatório. Contudo, faz-se necessária a realização de mais trabalhos para avaliar se essa terapia pode ser realmente estendida para a prática clínica.

Palavras-chave: Asma, inflamação, canabidiol, remodelamento

Abstract

Asthma represents a public health problem, and is traditionally classified as an atopic disease, which contact the allergen can elicit clinical signs such as airway inflammation, bronchial hyperresponsiveness and reversible airflow obstruction. After installation of the characteristic inflammatory process of asthma, there is migration of inflammatory cells into the lung and airways. Studies demonstrate the presence of helper T lymphocytes in the lungs of patients with asthma, these cells are involved in the production of cytokines that regulate the synthesis of immunoglobulins such as IgE. Knowing that cell interactions of the immune system and contact with antigens represent a crucial point in the pathophysiology of inflammatory diseases, the purpose of this study was to evaluate the anti-asthmatic potential of Cannabidiol (CBD) in this scenario, because it has been reported its role as anti-inflammatory immunomodulatory and antioxidant. For this purpose, two animal models were used: one in Balb/c and another in rats exposed to ovalbumin. After the animals were evaluated when the respiratory mechanics, cytokine levels, expression of CB1, CB2, MMP-2 and MMP-9 in lung lavage and blood. The evaluated animals treated with CBD showed a great decrease in pulmonary inflammatory profile when compared with the animals exposed to the asthma model, with the decrease of cytokines (IL-4, IL-5, IL-13, eotaxin) also showed improvement as the elasticity of the lung decreased. Static lung elastance of animals will receive treatment, confirming that potential with decrease of polymorphonuclear cells and airway hyperresponsiveness, reinforcing studies that also showed the anti-inflammatory role. However, it is necessary to carry out further studies to evaluate whether this therapy can actually be extended to clinical practice.

Key-words: Asthma, Inflammation, cannabidiol, remodeling

Lista de Figuras

Figura 1	46
Escala temporal dos procedimentos experimentais	
Figura 2	52
Método de Oclusão ao final da inspiração	
Figura 3.....	54
Retículo com 100 pontos e 50 linhas utilizado para quantificação de parâmetros morfométricos	
Figura 4.....	57
Escala temporal de procedimentos experimentais	
Figura 5.....	59
Porcentagem de aumento das vias aéreas	
Figura 6.....	60
Elastância estática no pulmão de camundongos	
Figura 7.....	62
Níveis de citocina IL-4 no pulmão e LBA de Camundongos	
Figura 8.....	62
Níveis de citocina IL-5 no pulmão e LBA	
Figura 9.....	63
Níveis de citocina IL-13 no pulmão e LBA	
Figura 10.....	63
Níveis de eotaxina no pulmão e LBA	
Figura 11.....	64
Níveis de citocina IL-9 no pulmão e LBA	
Figura 12.....	64
Expressão de citocinas com perfil Th1 em pulmão de Ratos Wistar	
Figura 13.....	65
Expressão de citocinas com perfil Th2 em pulmão de Ratos Wistar	
Figura 14.....	66
Expressão de Metaloproteinases MMP-2 e MMP-9 no pulmão de Camundongos	
Figura 15.....	66
Expressão de Receptores CB1 e CB2 no pulmão de Camundongos	

Lista de Tabelas

Tabela 1.....	60
Frações de área de alvéolos normais e colapsados no parênquima pulmonary.	
Tabela 2.....	61
Razão do número de células polimorfonucleares, mononucleares, e totais por área de tecido no parênquima pulmonary.	

Lista de Abreviaturas

AM251 – Antagonista de receptor CB1
AM630 – Antagonista do receptor CB2
APC – Célula apresentadora de antígeno
CB1 - Receptor canabinoide tipo 1
CB2 - Receptor canabinoide tipo 2
CBD - Canabidiol
CD80 – Molécula co-estimuladora
Células NK – Células natural killer
DATASUS - Departamento de Informática do SUS/MS
Fc - Proteína receptora presente na superfície das células
FEV1 - Volume expiratório máximo no primeiro segundo
GINA - Iniciativa Global para Asma
GM-CSF - Fator estimulador de colônias de macrófagos
ICAM-1- Molécula de adesão intracelular
IgE - Imunoglobulina E
IL-10 - Interleucina 10
IL-13 - Interleucina 13
IL-4 - Interleucina 4
IL-5 – Interleucina 5
IL-6 – Interleucina 6
MEC - Matriz Extracelular
MHCI - Complexo principal de histocompatibilidade I
MHCII - Complexo principal de histocompatibilidade II
OVA – Ovalbumina
P – Diferença de pressão
PEEP – Pressão positiva ao final da expiração
Pe_{1,L} – Pressão de retração elástica do pulmão.
Pi,L – Ponto de Inflexão.
PL – Pressão Transpulmonar.
P_{max,L} – Pressão Máxima.
PMN – Polimorfonuclear.
PNS - Pesquisa Nacional de Saúde
Ptr – Pressão traqueal
Teff – Linfócitos T Efetores
Th1 – Linfócito T Auxiliar
Th2 – Linfócito T Auxiliar
TNF- α – Fator de necrose tumoral
Treg – Linfócitos T Reguladores
TGF- β - Fator transformador de crescimento β

V – Medida do fluxo aéreo

V' – Fluxo Aéreo.

VCAM-1 - Molécula de adesão celular-vascular

VEGF – Fator de crescimento endotelial

V_T – Volume corrente

Sumário

1	Introdução	26
1.1	Definição e epidemiologia da asma	26
1.2	Inflamação na Asma	30
1.3	Remodelamento na Asma	33
1.4	Fármacos para o tratamento na Asma	35
1.5	Sistema Endocanabinóide e Receptores CB1 e CB2	37
1.6	Canabidiol.....	39
2	Objetivos Gerais.....	44
2.1	Objetivos Específicos	44
3	Materiais e Métodos.....	45
3.1	Animais.....	45
3.2	Manipulação dos Animais.....	45
<i>Capítulo I – Avaliações em Camundongos Balb/C</i>		<i>46</i>
3.3	Indução do modelo animal de asma.....	46
3.3.1	Sensibilização	46
3.3.2	Desafio Intratraqueal	46
3.4	Caracterização dos grupos experimentais	46
3.5	Tratamentos (Drogas e Doses).....	48
3.6	Mecânica Respiratória	48
3.7	Remoção dos pulmões	53
3.7.1	Preparação das Laminas para análise morfométrica	53
3.7.2	Análise morfométrica	54
3.8	Hiperresponsividade	55
3.9	Níveis de citocinas	56
3.10	Expressão de CB1, CB2 e Metaloproteinase	56
3.11	Análise estatística	57
<i>Capítulo II – Avaliações em Ratos Wistar.....</i>		<i>57</i>
3.12	Indução do modelo animal de asma.....	57

3.13 Níveis de citocinas	58
3.14 Análise estatística	58
4 Resultados	59
4.1 Função pulmonar	59
4.2 Morfometria pulmonar	60
4.3 Inflamação pulmonar	61
5 Discussão	67
6 Conclusão	73
7 Referências Bibliográficas	74

1 INTRODUÇÃO

1.1 DEFINIÇÃO E EPIDEMIOLOGIA DA ASMA

A asma é um grave problema de saúde pública em todo o mundo (GINA, 2015). Indivíduos de todas as idades em todos os continentes e países são afetados por essa doença crônica das vias aéreas, que quando não controlada pode interferir diretamente nas atividades de vida diária e limitar a qualidade de vida, podendo inclusive ser fatal. Há uma estimativa de que a asma afete cerca de 300 milhões de pessoas ao redor do mundo, e esse número tem aumentado consideravelmente (Busse, 2001; GINA, 2009). Nos últimos 20 anos tem se observado um aumento considerável no entendimento das bases patológicas da asma, celular, genética e molecular (Busse, 2001; Wilson et al., 2006; Anderson, 2008; GINA, 2009). A crescente preocupação com as doenças respiratórias foi formalizada no Fórum da Sociedade Internacional de Respiração, que declarou 2010 como o “Ano do Pulmão”, com o objetivo de enfatizar a pesquisa, a conscientização da população e fomentar políticas públicas a respeito das doenças respiratórias.

Atualmente, apesar dos crescentes avanços no entendimento de sua fisiopatologia e da introdução de novas terapias, a asma persiste como um importante problema de Saúde Pública em todo o mundo, visto que segundo dados da GINA - *Global Initiative of Asthma*, que coleta dados sobre a asma em todo o mundo desde 1989, a asma: 1) acomete cerca de 300 milhões de pessoas em todo mundo de todas as faixas etárias e sexos, independentemente da área geográfica, sendo causa de sofrimento tanto para seus portadores quanto para suas famílias; 2) é a principal causa de absenteísmo nas escolas, respondendo por muitas noites perdidas de sono; 3) limita a vida social e a produtividade, levando a aposentadorias precoces; 4) acarreta grandes despesas em função dos múltiplos atendimentos pelas unidades de saúde; e 5) pode levar a morte. Logo, a asma acarreta custos: humano, social e financeiro (Gina, 2010).

As taxas de hospitalização por asma em maiores de 20 anos diminuíram em 49% entre 2000 e 2010. Já em 2011 foram registradas pelo DATASUS 160 mil hospitalizações em todas as idades, dado que colocou a asma como a quarta causa de internações. A taxa média de mortalidade no país, entre 1998 e 2007, foi de 1,52/100.000 habitantes

(variação, 0,85-1,72/100.000 habitantes), com estabilidade na tendência temporal desse período (Datusus, 2015). O nível de controle da asma, a gravidade da doença e os recursos médicos utilizados por asmáticos brasileiros são pouco documentados, pouquíssimos estudos trazem o índice de prevalência e incidência da asma nos últimos anos. Alguns estudos mais recentes concentram-se documentar incidências regionais, como o de Silva e colaboradores de 2009, que acompanhou crianças asmáticas da Amazonas durante 12 meses, e pode concluir que as internações tiveram aumento entre março e maio, os meses mais chuvosos, e as hospitalizações anuais por asma decresceram de 8,1 para 2,6 internações por mil habitantes no decorrer do período estudado (Silva et al., 2009).

Outro estudo mostrou que o custo direto da asma (utilização de serviços de saúde e medicações) foi o dobro entre pacientes com asma não controlada que entre aqueles com asma controlada, sendo a falta de controle da asma o maior componente relacionado à utilização dos serviços de saúde. Entretanto, o gasto direto relacionado às medicações foi maior entre os portadores de asma controlada, sendo que 82,2% desses utilizavam regularmente corticoides inalatórios. O custo da asma aumenta proporcionalmente com a gravidade da doença. O custo indireto (número de dias perdidos de escola e trabalho) foi superior no grupo com asma não controlada (Souza-Machado et al., 2010). Os gastos com asma grave consomem quase 25% da renda familiar dos pacientes da classe menos favorecida, sendo que a recomendação da Organização Mundial de Saúde é de que esse montante não exceda a 5% da renda familiar (Franco et al., 2009).

Um estudo multicêntrico, o *International Study for Asthma and Allergies in Childhood* (Isaac, 1998), realizado em 56 países evidenciou que países desenvolvidos apresentavam maior prevalência de asma do que países ainda em desenvolvimento. Tais resultados estão de acordo com a hipótese de higiene, na qual se acredita que o contato precoce com diversos antígenos estimularia a resposta imune Th1 de modo que durante a resposta atópica, com exacerbação da resposta imune Th2, o desequilíbrio entre ambas seria evitado. Portanto, países subdesenvolvidos, que frequentemente possuem infraestruturas e medidas de saneamento básico precárias, teriam maior contato com diferentes antígenos, e, conseqüentemente, a prevalência de asma seria reduzida (Strachan et al., 2000). Corroborando com esses dados, um estudo no sul da Califórnia demonstrou que a melhoria da qualidade do

ar esta associado a melhorias clinicamente significativas na função pulmonar durante a infância (Gauderman, 2015). No entanto, sugere-se que sua prevalência aumenta globalmente em torno de 50% a cada década (Gina 2010).

A asma atinge 6,4 milhões de brasileiros acima de 18 anos, de acordo com a Pesquisa Nacional de Saúde (PNS) do Ministério da Saúde e Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). As mulheres são as mais acometidas pela doença: cerca de 3,9 milhões delas afirmaram ter diagnóstico da enfermidade contra 2,4 milhões de homens, ou seja, prevalência de 39% a mais entre o sexo feminino (Ministério da Saúde, 2015). A região Sudeste apresenta a maior prevalência de asma (21%), e consequentemente, a maior taxa de mortalidade quando comparada às demais regiões brasileiras provavelmente devido a maior exposição da sua população a partículas poluentes no ar ambiente (Chatkin et al., 2003; Campos et al., 2004; Datusus, 2015).

Solé e colaboradores em 2006 estimaram uma porcentagem de 24% e 19%, entre 12 crianças e adolescentes, respectivamente, possuem sintomas indicativos de asma (Solé et al., 2006). Apesar de serem apenas 5-10% dos casos, pacientes com asma grave apresentam maior morbimortalidade relativa e são responsáveis por um consumo desproporcionalmente alto dos recursos de saúde em relação aos grupos de menor gravidade. Portadores de asma grave não controlada procuram 15 vezes mais as unidades de emergência médica e são hospitalizados 20 vezes mais do que os asmáticos moderados (Jardim Jr, 2007; Ponte et al., 2007).

A história natural da asma e as condições determinantes de evolução para as formas moderadas ou graves não estão completamente estabelecidas (Xisto et al., 2005). Asma, que no grego significa respiração curta, é definida como uma doença inflamatória crônica das vias aéreas, onde tanto as células inflamatórias, como as células estruturais, desempenham importante papel. Caracterizada ainda por hiperresponsividade brônquica (intensidade da broncoconstrição em resposta a um estímulo), variável, pelo menos parcialmente reversível espontaneamente ou por intervenção farmacológica (Xisto et al., 2005). Entretanto, a descoberta de que a inflamação na asma se estende para todo o trato respiratório se deu há alguns anos e mudou o escopo da pesquisa desta doença (Busse, 2001; Tulic et al., 2003; Xisto et al., 2005; Corren et al., 2008). Pacientes asmáticos podem apresentar episódios recorrentes de sibilância, dispnéia, aperto no peito, e tosse

principalmente à noite ou no início da manhã. Assim, sua definição torna-se bastante geral, pois se baseia em parâmetros clínicos e fisiológicos (National Heart, 1997; Wenzel, 2007; Bateman, 2008; Hargreave & Nair, 2009).

Clinicamente, apesar de serem reconhecidas várias formas distintas de asma, ela é comumente classificada como *Atópica* (evidência de sensibilização a alérgenos) ou *Não Atópica* (sem evidência de sensibilização a alérgenos). Entretanto, tradicionalmente tem sido considerada como uma doença atópica, onde a sensibilização e a exposição continuada a alérgenos pode resultar em sinais clínicos da doença como: inflamação das vias aéreas, hiperresponsividade brônquica, e obstrução reversível do fluxo aéreo (Pearce, 1999). No entanto, o contato com alérgenos ocorre em metade da população adulta, mas a maioria desta, não desenvolve asma (Pearce, 1999).

A asma é uma doença complexa cuja expressão clínica pode ser desencadeada por componentes hereditários, genéticos, ambientais, (poluição, alérgenos, cigarro), obesidade e associada a fatores sexo-dependentes (Gina, 2010; Antunes et al., 2010). As regiões 5q13 e 6p21 do cromossomo, bem como polimorfismos no gene *ADAM33* estão ligadas ao fenótipo asmático (Teerlink et al., 2009; Weiss et al., 2009; Girodet et al., 2010). Adicionalmente, Kim e colaboradores mostraram que polimorfismos do gene *ADCY9* provavelmente afetam a resposta terapêutica a broncodilatadores de longa duração (Kim et al., 2011). Os fatores ambientais também contribuem de forma significativa para os episódios de asma (Martinez et al., 2007). Essa influência é fundamentada na grande variação da prevalência de asma em populações geneticamente semelhantes que habitam ambientes distintos, assim como em populações migratórias, anteriormente saudáveis, que desenvolveram asma após mudança de ambiente. Assim, infere-se que as doenças alérgicas são resultantes de uma interação genética com fatores ambientais (Holloway et al., 2010).

Krung e colaboradores, mostraram que o medicamento o SB010, derivado da enzima ADN específica para GATA3 pertencente a família de fatores de transcrição GATA, atenuou a tanto a resposta de fase inicial, quanto a resposta de fase tardia após provocação ao alérgeno. A GATA3 é um importante regulador no desenvolvimento dos linfócitos T, e induz a secreção e interleucinas 4, 5 e 13 pelos linfócitos Th2 (Krung, 2015). Dessa forma, o mapeamento dos genes envolvidos na asma é fundamental para a identificação precoce dos indivíduos susceptíveis à mesma, bem como o melhor entendimento de sua

fisiopatologia e desenvolvimento de novas terapias (Bosco et al., 2010; Gu & Zhao 2011).

1.2 INFLAMAÇÃO NA ASMA

A inflamação brônquica constitui o fator mais importante relacionado à patogenia da asma. Tal processo inflamatório resulta de complexas interações entre diversas células e mediadores inflamatórios, além de células estruturais das vias aéreas, dentre elas: mastócitos, linfócitos, eosinófilos, macrófagos (Pelaia et al., 2012), neutrófilos, fibroblastos, células endoteliais e musculares (Kay et al., 2005). Este processo pode causar anormalidades permanentes nas vias aéreas, caracterizando o processo de remodelamento (Sumi et al., 2007; Holgate et al., 2010). Uma característica fundamental da asma associada à alergia é a capacidade de sensibilização das vias aéreas para reconhecer alérgenos ambientais e gerar uma resposta de células T helper2 (Th2) aos alérgenos. Observa-se que 40% da população ocidental é atópica, mas apenas 7% expressa sua atopia na forma de asma (Beasley et al., 2001).

Primeiramente, em associação ao epitélio das vias aéreas e mucosas existe uma população celular especializada em apresentação de antígenos, são as chamadas células apresentadoras de antígenos (APCs). Estas células expressam receptores do sistema imune e possuem potencial para capturar e processar alérgenos em pequenos peptídeos e, em seguida, apresenta-los via complexo principal de histocompatibilidade MHCI e MHCII para o reconhecimento pelos receptores de célula T (Sallmann, et al., 2011). A absorção de alérgenos nas vias aéreas por células dendríticas (DCs) é um processo ativo e desempenha papel fundamental no início do processo inflamatório da asma (Hammad & Lambrecht, 2006; Sallmann, et al., 2011). Estas células estão estrategicamente localizadas em regiões de entrada de micro-organismos e antígenos estranhos e em tecidos que podem ser colonizados por micro-organismo. Tais células, funcionalmente imaturas, capturam o antígeno e o transportam até a região das células T no linfonodo mediastinal, onde promoverão a diferenciação, proliferação e ativação de células T CD4⁺ (Upham & Stumbles, 2003). Este processo pode ser acentuado pela ligação de imunoglobulina IgE a receptores de alta afinidade presentes nas células dendríticas (Kitamura et al., 2007). Recentemente, foi demonstrado que os basófilos também desempenham importante papel no processo de apresentação do antígeno e, conseqüente, proliferação e ativação de células T CD4⁺ em um fenótipo Th2 (Nakanishi et al., 2010).

Os linfócitos T auxiliares CD4+ incluem efetores (Teff), que atuam na proteção contra patógenos, e reguladores (Treg), que possuem a função de suprimir a resposta imune (Cosmi et al., 2011). Recentemente, foi demonstrado que as células T reguladoras, encontradas em baixo número em asmáticos (Matsumoto et al., 2009), reduzem de maneira significativa os processos inflamatório e de remodelamento da asma (Burchell et al., 2009). Tal efeito pode estar associado à produção de interleucina IL-10, visto que em camundongos deficientes nesta citocina o efeito regulatório das células T não foi observado (Katrin et al., 2008). Os linfócitos contribuem de forma significativa para a imunopatologia da asma, sobretudo através das células Th2 (Anderson et al., 2002; Barnes, 2008). Após o desafio com alérgeno, há aumento das células T ativadas e de citocinas Th2, e estudos demonstram que células Th2 estão presentes no pulmão de pacientes com asma, especialmente pacientes com asma alérgica (Robinson, 1992).

Nos últimos anos o foco tem sido tentar desvendar os mecanismos moleculares envolvidos na alergenicidade e sensibilização Th2 (Horner, 2010). As células Th2 produzem citocinas que regulam a síntese de imunoglobulinas específicas [IgE regulada pela interleucina 4 (IL-4)], o recrutamento de eosinófilos (IL-5), o recrutamento de crescimento de mastócitos (IL-9), secreção de muco e diferenciação e produção de IgE (IL-13) (Holgate, 2010). Na biópsia brônquica de asmáticos, observa-se uma ativação de mastócitos e basófilos e infiltração eosinófila, existindo uma correlação positiva entre o número de linfócitos Th2 presentes nas vias aéreas e a hiperreatividade brônquica e gravidade da asma (Detoraki et al., 2015). No entanto, o mecanismo pelo qual as células dendríticas participam na diferenciação da resposta imune via Th1 ou via Th2, não está bem estabelecido. Acredita-se que moléculas co-estimulatórias, como CD80, e de adesão, expressas na superfície da célula dendrítica influenciam a resposta imune e têm papel essencial na diferenciação da célula Th2, no aumento no número de eosinófilos e na perpetuação do processo inflamatório (Schweitzer et al., 1997; Zhu et al., 2010).

Como já mencionado, a IL-4 e IL-13 agem sobre os linfócitos B promovendo sua diferenciação e produção de IgE. Esta, após sua ligação com os mastócitos, parece estar envolvida na infiltração celular de eosinófilos e neutrófilos (He & Walls, 1997), e, conseqüentemente, no processo inflamatório característico da asma, visto que estimulará tais células a liberar diversos mediadores tais como: histamina e triptase. Essa última, além de alterar muitas proteínas da cascata de coagulação,

estimula a proliferação de células do músculo liso e fibroblastos, sendo capaz de estimular a síntese de colágeno (Bousquet et al., 2000; Kaur et al., 2006) e de alguns mediadores lipídicos como leucotrienos, prostanoídes e citocinas (Bradding et al., 2006).

Após a instalação do processo inflamatório característico da asma, ocorre a migração de células inflamatórias para o pulmão e vias aéreas. Uma vez que essas células são recrutadas para os pulmões causam o desenvolvimento de inflamação eosinofílica e aumento da responsividade das vias aéreas. Os eosinófilos desempenham um importante papel na asma alérgica, estes não estão presentes somente na parede das vias aéreas durante a asma não controlada, mas também são encontrados em grande número no escarro e fluido do lavado broncoalveolar (Kay, 2005; Lemiere et al., 2006).

Os eosinófilos são as principais células inflamatórias envolvidas na fisiopatologia da asma através da liberação de diferentes mediadores: peroxidase eosinofílica, proteína catiônica eosinofílica, prostaciclina, leucotrienos (Kay et al., 2005; Kariyawasam & Robinson et al., 2006; Uhm et al., 2012), além de diferentes fatores de crescimento como o derivado de plaquetas (PDGF) (Ohno et al., 1996) e o fator transformador de crescimento- β (TGF- β) (Pincus et al., 1987) que atuam de forma significativa sobre o processo inflamatório e, conseqüente, remodelamento das vias aéreas. Deste modo, Woodruff e colaboradores correlacionaram a eosinofilia brônquica tanto à gravidade da asma quanto à hiperresponsividade brônquica (Woodruff et al., 2001). Os eosinófilos são recrutados para as vias aéreas após exposição a um alérgeno, por meio da ação de diferentes fatores como: citocinas [IL-3, IL-5 e fator de estimulação de colônias de granulócitos e mastócitos (GM-CSF)], quimiocinas (eotaxina e RANTES) e moléculas de adesão [molécula de adesão intercelular (ICAM-1) e molécula de adesão celular-vascular (VCAM-1)] (Lemiere et al., 2006; Siddiqui et al., 2008) liberados tanto pelas células inflamatórias como pelas residentes do próprio epitélio das vias aéreas (Zietkowski et al., 2008). A eosinofilia na asma é estimulada não somente por um aumento na taxa ou frequência de divisão/maturação de células progenitoras já existentes na circulação, mas também por um aumento na produção de células progenitoras de eosinófilos na medula óssea, tais como as células CD34⁺ (Sehmi et al., 2003).

1.3 REMODELAMENTO NA ASMA

O termo remodelamento foi inicialmente empregado em pacientes com asma por Huber e Koessler em 1922, que descreveram redução significativa do lúmen das vias aéreas, hipertrofia mucosa, espessamento das vias aéreas e grande infiltrado de células inflamatórias (Huber & Koessler, 1922). Esses achados foram confirmados por diversos outros estudos que também evidenciaram fibrose subepitelial, hiperplasia de glândula mucosa, hiperplasia e hipertrofia de miofibroblastos e desarranjo de células ciliadas (Silva et al., 2008; Li et al., 2011).

O remodelamento na asma é o termo empregado para descrever o processo dinâmico que leva a mudanças estruturais das vias aéreas e parênquima pulmonar. Tais alterações decorrem de diversos eventos como proliferação e ativação celulares, assim como produção e degradação de matriz extracelular (MEC) (Li et al., 2011). Além das células inflamatórias recrutadas, elementos mesenquimais como fibroblastos e miofibroblastos também estão aumentados em indivíduos asmáticos (Gizychki et al., 1997). Embora seja difícil definir funcionalmente, do ponto de vista estrutural, existem evidências de que além da inflamação das vias aéreas, alterações nos elementos figurados dessas vias possam contribuir significativamente para a fisiopatologia da asma (James & Carroll, 2000). Estes parecem desempenhar importante papel na manutenção do processo inflamatório e de remodelamento da asma. Tais tipos celulares são capazes de produzir citocinas, fatores de crescimento, além de diversos componentes da MEC, tais como: fibras colágenas, elásticas e reticulares, laminina, fibronectina, proteoglicanos e glicosaminoglicanos. Deste modo, fica evidente que ambos os tipos celulares contribuem para os processos de fibrose subepitelial e peribrônquica característicos da asma (Morishima et al., 2001).

Até o momento, os fatores que iniciam e perpetuam o remodelamento das vias aéreas na asma não são totalmente conhecidos. O remodelamento inclui danos epiteliais, espessamento da membrana basal reticular, hiperplasia e hipertrofia da musculatura lisa, hiperplasia das células caliciformes epiteliais, neoformação vascular e nervosa e deposição de proteínas na matriz MEC (Ko et al., 2005). Essas alterações têm atraído interesse devido à observação de que são pobremente controladas com estratégias terapêuticas anti-inflamatórias (Busse et al., 2004).

Diversos fatores de crescimento e mediadores inflamatórios participam do processo de remodelamento. Nesse contexto, o TGF- β

tem o potencial de estimular fibroblastos e induzir a fibrose subepitelial (Doherty & Broide, 2007). Alguns fatores de transcrição como o fator de transcrição nuclear κB (NF- κB) têm papel importante na patogênese do remodelamento da via aérea. Broide e colaboradores mostraram que camundongos que possuem redução seletiva de quinase inibidora do IKB (Ikk), necessária para a ativação do NF- κB , apresentaram uma diminuição significativa da fibrose peribrônquica, do nível de TGF- β no fluido do lavado bronco-alveolar, da produção de muco e infiltração eosinofílica (Broide et al., 2005).

As mudanças estruturais e funcionais mais importantes na microcirculação das vias aéreas ocorrem a partir do brotamento em vasos pré-existentes. A angiogênese é um fenômeno importante presente no processo de remodelamento (Zanini et al., 2010). O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), também conhecido como fator de permeabilidade vascular, tem papel fundamental na fisiopatologia da angiogênese. Além disso, o VEGF possui outras funções importantes como proliferação e migração celular endotelial, vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, proliferação das células da musculatura lisa e migração de mastócitos, eosinófilos e basófilos (Ribatti et al., 2004).

Apesar de serem consideradas células fixas da MEC, os fibroblastos têm capacidade proliferativa, sendo um dos principais precursores dos miofibroblastos (Vignola et al., 2003). Adicionalmente, estudos recentes têm sugerido que também os fibrócitos, uma população de células progenitoras circulantes derivadas da medula óssea, podem dar origem aos miofibroblastos contribuindo para o remodelamento (Hughes et al., 2003; Schmidt et al., 2003; Wang et al., 2008; Saunders et al., 2009). Na fibrose pulmonar já foi evidenciado que o número de fibrócitos circulantes é um importante indicador de mau prognóstico (Moeller et al., 2009).

Estudos demonstraram que a musculatura lisa das vias aéreas também pode contribuir para a perpetuação da inflamação tissular das mesmas em asmáticos, já que as células musculares lisas podem agir como células inflamatórias através de sua aumentada capacidade de produzir citocinas e quimiocinas (Vermeer et al., 2003; Panettier et al., 2008; Doeing et al., 2013). Em um estudo James sugere que o aumento do músculo e a alteração de sua função durante a asma sejam componentes importantes para a hiperresponsividade que caracteriza esta doença (James, 2005). O paciente asmático pode apresentar a obstrução das vias aéreas, devido à contração da musculatura lisa brônquica, em dois momentos distintos, imediatamente ao contato com o alérgeno,

instalando-se em poucos minutos e com duração de até 2 horas conhecido como fase imediata da doença ou tardiamente, ocorrendo após 3 horas do primeiro contato com o alérgeno, conhecido como fase tardia da asma (Stumbles et al., 1998; Vieira et al., 2007a)

Contudo diversos estudos, com o objetivo de identificar alterações celulares e moleculares na musculatura lisa das vias aéreas, que possam ser responsáveis por tais características na doença, têm sido realizados, mas tais mecanismos ainda permanecem obscuros. Tais fatores também são observados em pacientes asmáticos e em estudos experimentais, sugerindo que o remodelamento brônquico é devido à liberação de diversos fatores inflamatórios, de crescimento celular e de liberação de citocinas (James, 2005; Johnson & Knox, 1997; Vieira et al. 2007b).

1.4 FÁRMACOS PARA O TRATAMENTO DA ASMA

O controle da asma inclui cinco passos, estes consistem num sistema de vigilância crescente onde a exacerbação da doença inclui a utilização de novos medicamentos de combate ao broncoespasmo e controle da inflamação, bem como o aumento nas dosagens dos medicamentos já utilizados ou substituição dos mesmos. A manutenção dos sinais e sintomas da doença por um período de pelo menos três meses, dá direito ao paciente regredir a utilização de medicamentos de combate para o passo anterior (Hoshino et al., 2009).

Os medicamentos para o tratamento da asma incluem os agonistas β_2 seletivos, os glicocorticoides, os anticolinérgicos, os antagonistas de receptor de leucotrienos, as metilxantinas, mais recentemente, o anticorpo monoclonal anti-IgE, e outros anticorpos monoclonais que atuam em citocinas específicas (Hoshino et al., 2009). Medicamentos esteroides para o tratamento de asma apresentam-se como objeto de intenso estudo nas últimas três décadas, seus mecanismos de ação, sua estrutura, regulação e receptores atualmente são muito mais compreendidos e pesquisados (Barnes, 2006). A utilização de corticosteroides figura como a principal classe de medicamentos empregada por seus benefícios anti-inflamatórios para o tratamento da asma. Entretanto, além de uma parcela importante de pacientes asmáticos apresentar resistência adoção de corticoides como forma de tratamento da doença, um acentuado grau de remodelamento está presente em indivíduos cuja causa de óbito foi à asma e faziam regularmente o uso destes medicamentos (Kay, 2005).

Ademais, mesmo os glicocorticoides modernos apresentam ainda efeitos colaterais relacionados à sua utilização crônica (Barnes, 2006). Assim, fica claro que os corticoides são a maneira mais efetiva de tratamento para pacientes asmáticos, entretanto seus efeitos adversos exigem esforços para se desenvolver esteroides com potenciais efeitos colaterais reduzidos e/ou identificação de substâncias capazes de substituí-los no tratamento dessa doença.

Assim, o desenvolvimento de novas terapias para a asma grave deve estar intimamente relacionado a cada indivíduo, a fim de identificar os pacientes que podem ser mais ou menos beneficiados de acordo com cada intervenção terapêutica (Thomson et al., 2011). Além disso, não há terapia disponível capaz de reverter o processo de remodelamento pulmonar, que continua sendo visto como um alvo para as novas estratégias terapêuticas (Li et al., 2011). As citocinas desempenham um papel crítico no desenvolvimento da inflamação crônica em diversas doenças, incluindo a asma (Chung & Barnes, 1999) o que leva a uma busca intensiva para terapias mais específica à doença, e inibidores de citocinas e quimiocinas, tornam-se figuras chaves nessa nova abordagem terapêutica (Barnes, 2000).

Existem várias abordagens possíveis para inibir citocinas específicas (Barnes, 1999; Barnes, 2000). Recentemente, pesquisadores tem mostrado a eficácia de novas terapias, o mepolizumabe, um anticorpo monoclonal que se liga e inativa a IL-5, foi eficaz em diminuir exacerbações em pacientes com asma severa eosinofílica (Samitas K, et al., 2011; Walsh, 2012). Estes pacientes representam um desafio, já que a única estratégia de tratamento são os glicocorticoides. Por outro lado, já foi demonstrado que o tratamento em paralelo com o mepolizumabe pode permitir a diminuição das doses de corticoides, garantindo a eficácia do tratamento (Bel et al., 2014; Ortega et al., 2014).

Outro anticorpo monoclonal que tem demonstrado ser eficaz no tratamento da asma é o Dupilumab, capaz de inibir a IL-4 e sinalização de IL-13. Em um estudo com pacientes com elevados níveis de eosinófilos, o Dupilumab diminuiu o número de exacerbações induzida pela retirada do corticoide (Wenzel et al., 2013). O Lebrikizumab, anticorpo monoclonal bloqueador de IL-13, capaz de inibir sua sinalização, foi testado em pacientes asmáticos não controlados, e reduziu a taxa de exacerbações e melhorou o FEV1 destes pacientes (Hanania et al., 2015).

Nesse sentido, a resposta inflamatória no pulmão tem sido amplamente compreendida, e é um mecanismo pelo qual o corpo

responde e se protege de eventos infecciosos e não infecciosos, através de mecanismos que podem ser inespecífico ou antígeno específico. A resposta inflamatória é geralmente protetora, mas tem potencial de causar lesões no tecido incluindo as vias aéreas e levar alterações crônicas e irreversíveis. Novas abordagens para a terapia baseiam-se em diminuir o processo inflamatório decorrente da asma, diminuindo assim o remodelamento tecidual e tornar o paciente menos responsivo a fatores desencadeantes.

Contudo, fornecer um resumo de evidências sobre cuidados com a asma não é suficiente para mudar os resultados; existe agora uma forte base de evidências sobre métodos eficazes (e ineficazes) para implementação de diretrizes clínicas e alcançar a mudança de comportamento dos profissionais de saúde e pacientes (Boulet et al., 2012). Recomendações baseadas em evidências devem ser apresentados de uma forma que é ao mesmo tempo acessível e relevante para os clínicos, e integradas em estratégias que são viáveis para os profissionais de saúde para usar em sua prática clínica ocupado. Por isso, o relatório GINA, se concentra não só forte evidência existente sobre o que o tratamento deve ser recomendado, mas também sobre a clareza da linguagem e sobre a inclusão de ferramentas clínicas (baseada em evidências). As recomendações são agora apresentadas de uma forma amigável, com linguagem clara, ferramentas clínicas e fluxogramas. O resultado é um relatório que é como manual prático, que pode ser adaptado para, sistema local social, étnica saúde e as condições regulamentares para as diretrizes nacionais. (Renddel et al., 2015).

1.5 SISTEMA ENDOCANABINÓIDE E RECEPTORES CB1 E CB2

Blalock (1984) propôs que o sistema imune, além da sua função na defesa do organismo, atuaria como um órgão sensorial especial; servindo neste caso, para detectar estímulos que não poderiam ser ouvidos, vistos, cheirados, degustados ou sentidos (Blalock, 1984). Especificamente, ele sugeriu que o sistema imune poderia funcionar como um “Sexto Sentido” capaz de detectar e levar o organismo a responder a organismos invasores tais como patógenos ou a presença de tumores ou alérgenos. Por ter grande sensibilidade e especificidade sabe-se hoje que esse “órgão sensorial”, mobiliza o corpo a responder prontamente a esses desafios; esta capacidade sensorial tem seu fundamento nas bases moleculares das interações entre os sistemas imune e neuroendócrino já que os leucócitos individualmente não estão diretamente conectados ao SNC (Blalock, 2005).

Esta distribuição ubíqua de receptores e seus ligantes é de vital importância para o estabelecimento da comunicação bidirecional entre estes grandes sistemas. O sistema endocanabinóide se encaixa perfeitamente no contexto das bases moleculares das interações imuno-neuroendócrinas. Vem sendo demonstrado que o sistema endocanabinóide tem um amplo espectro de influências sobre os circuitos neuronais excitatório e inibitório, principalmente devido à larga distribuição de receptores canabinóides (Rodriguez de Fonseca et al., 2005).

De fato, um receptor específico para os canabinóides foi clonado e caracterizado em 1990. Um segundo receptor foi identificado nos anos seguintes. O Comitê para Nomenclatura de Receptores e Classificação de Drogas da União Internacional de Farmacologia e Terapêutica Experimental (*International Union for Pharmacology and Experimental Therapeutics* - IUPHAR) denominou esses receptores, pela ordem de descoberta, em receptores canabinóides do subtipo 1 (CB1) e subtipo 2 (CB2) (Howlett et al, 2002).

O primeiro é responsável pelos efeitos centrais dos canabinóides, enquanto o segundo deve mediar efeitos periféricos. Ambos são receptores acoplados a uma proteína G que, quando ativada, inibe a enzima adenilato ciclase, aumenta a atividade de canais de potássio e inibe canais de cálcio, modulando a liberação de outros neurotransmissores (Piomelli et al, 2003). Desta forma, vem sendo demonstrado que os (endo) canabinóides são capazes de modelar a atividade do sistema imune (Klein et al., 2003).

A partir desta descoberta foi demonstrado que esses receptores estão amplamente distribuídos por todo o Sistema Nervoso Central (SNC) sendo o subtipo de receptor CB1 aquele com a maior expressão entre todos os receptores ligados à proteína G no cérebro (Herkenham et al., 1991; Mailleux & Vanderhaeghen, 1992; Glass et al.; 1997). De fato, o receptor CB1 está presente em todas as regiões do SNC incluindo o córtex, o hipocampo, o cerebelo, os gânglios da base, a amígdala, o tronco encefálico, o hipotálamo e a pituitária (Hashimotodani et al.; 2007). Fora do SNC, o receptor CB1 também está expresso no coração, fígado, rins, baço, células imunes, intestino, testículos e ovários (Pertwee, 2004); estando expresso também em células do sistema imune, apresentando-se aqui uma expressão menor que aquela do receptor CB2 (Klein et al.; 1998). Neste sentido, devido à expressão predominante de receptor CB1 no SNC, ele é geralmente referido como o receptor canabinóide cerebral (Breivogel & Childers, 1998).

Logo o receptor CB2 foi caracterizado na periferia (macrófagos e baço) um segundo tipo de receptor canabinóide, o receptor CB2 (Munro et al.; 1993). Mostrou-se em especial a expressão predominante deste receptor em células B, células T e macrófagos, assim como no baço e no timo de camundongos (Schatz et al., 1997). O receptor CB2 foi descrito por muito tempo como sendo o receptor canabinóide periférico. Mostrou-se que as sub populações celulares do sangue humano apresentam diferentes graus de expressão de receptores CB2, como segue: células B > células NK > monócitos > neutrófilos > células T CD8 > células T CD4 (Galiege et al., 1995).

Os dados de literatura ainda apresentam controvérsias a respeito da expressão de receptores CB2 no SNC. Há dados substanciais indicando a expressão de receptores CB2 na micróglia e o aumento da sua expressão em condições neuroinflamatórias, inflamação periférica e nocicepção (Atwood & Mackie, 2010). No entanto, não há evidências indicativas de expressão de receptores CB2 em neurônios. Atualmente alguns trabalhos conseguiram mostrar pequenas quantidades deste receptor expressas em áreas como: tronco encefálico, cerebelo, córtex, hipocampo, tálamo, hipotálamo, dentre outros, e ainda que, em determinadas condições, a expressão deste receptor está aumentada (Atwood & Mackie, 2010).

1.6 CANABIDIOL

O canabidiol (CBD) pode ser considerado um velho canabinóide derivado da *Cannabis sativa*. O isolamento do CBD, o principal canabinóide não-psicotrópico da maconha, aconteceu em 1940 (Adams et al., 1973) e a caracterização da sua estrutura molecular ocorreu em 1963 (Michoulam & Shvo, 1963). Mesmo após a caracterização de sua estrutura molecular, poucos estudos farmacológicos foram realizados utilizando o CBD. Na década de 70 o grupo do Prof. Dr. Carlini foi responsável por um considerável número de publicações avaliando os efeitos anti-epiléticos do CBD e, também, os efeitos da interação do CBD com o δ 9-Tetrahidronabinol (THC) (Carlini et al., 1973; Karniol & Carlini, 1973). No entanto, era notório que o CBD não apresentava efeitos farmacológicos similares aos do THC, o que gerou desinteresse da comunidade científica nesta molécula. Somente quando se descobriu o sistema endocanabinóide, no início da década de 90, foi que se começou a entender a diversidade de mecanismos de ação do CBD e, então, a partir dos anos 2000, um grande número de publicações

apontam os potenciais efeitos terapêuticos desse fármaco (Zuardi, 2008).

A composição química da *Cannabis* tem sido estudada por muitos anos. Aproximadamente 500 compostos foram identificados na planta destacando-se: terpenos, açúcares, hidrocarbonetos, esteróides, flavonóides, compostos nitrogenados, aminoácidos, entre outros (Radwan et al., 2008). Entre os compostos presentes na *Cannabis*, ressaltam-se os canabinóides que são encontrados exclusivamente nesta planta. Os canabinóides são compostos terpenofenólicos com 21 átomos de carbono e representam a principal classe dentre os constituintes da *Cannabis*. Estes compostos são secretados pelos tricomas da planta. Esses tricomas são encontrados em partes específicas das inflorescências nas espécies masculina e feminina, sendo que esta região contém as maiores concentrações dos canabinóides, seguido pelas folhas, menores quantidades são encontradas no caule e raiz e nenhuma nos frutos (De Backer et al., 2009).

Até 2008, 86 canabinóides foram isolados da *Cannabis* (Ahmed et al., 2008). O primeiro estudo sobre o isolamento, em forma pura, de um princípio ativo da *Cannabis*, o Δ^9 -tetraidrocanabinol (Δ^9 -THC) foi reportado em 1964 por Gaoni e Mechoulam. Devido ao grande interesse nos efeitos causados pelos compostos extraídos da *Cannabis*, vários estudos têm sido realizados com o objetivo de identificar possíveis relações entre a estrutura química e a atividade biológica apresentada por estes compostos. Na década de 70, vários canabinóides foram isolados e sintetizados e as principais rotas de síntese e biossíntese foram elucidadas (Brenneisen, 1993).

Os canabinóides são biossintetizados pelo metabolismo da planta na forma de ácidos carboxílicos. Os tipos mais comuns encontrados são o ácido Δ^9 -tetraidrocanabinólico A (THCA), ácido canabidiólico (CBDA) e o ácido canabigerólico (CBGA). O CBGA é o precursor direto do THCA, CBDA e o ácido canabinocrenólico (CBCA). Como o grupo carboxil é instável, este é facilmente perdido na forma de CO₂, sob influência de luz, calor, estocagem prolongada ou quando a *Cannabis* é consumida, resultando em seus análogos neutros correspondentes: Δ^9 -THC, canabidiol (CBD) e canabigerol (CBG). A conversão mais importante é a transformação do THCA em Δ^9 -THC, o qual é o principal constituinte psicoativo presente na *Cannabis* (Thakur et al., 2005).

O CBD apresenta significativo efeito anticonvulsivante e sedativo, não sendo um componente psicoativo (Thakur et al., 2005). E já são

descritos por exercer um potente efeito anti-inflamatório, imunomodulador, e analgésico (Cunha et al., 1980, Thakur et al., 2005). Também têm sido demonstrados que seus efeitos como imunomodulador são bem tolerados em seres humanos (Pertwee, 2004). Além disso, a administração de CBD em um modelo animal da doença de Alzheimer demonstrou um aumento significativo na sobrevivência dos animais, supostamente por uma combinação de ações neuroprotetoras, antioxidantes e antiapoptóticas (Iuvone et al., 2004).

O número de publicações sobre o CBD aumentou consideravelmente nos últimos anos e sustenta a ideia de que o CBD possui uma gama de possíveis efeitos terapêuticos. Em 1980 já foi demonstrado que o canabidiol diminuía crises epiléticas em indivíduos com diagnóstico de epilepsia focal temporal com generalização secundária. Cunha acompanhou por 4 meses 15 pacientes diagnosticados com epilepsia, e 8 destes, receberam 200 a 300 mg de canabidiol e os outros receberam placebo. Quatro dos indivíduos que receberam canabidiol ficaram livres de crises, 3 melhoraram e em 1 a substância não modificou as crises epiléticas. Os 7 indivíduos que receberam placebo ficaram com suas crises inalteradas (Cunha, 1980). A partir disso, o canabidiol tem sido alvo de estudo em diversas patologias diferentes, e recentemente uma revisão de Zhornitsky and Potwin, nos mostra que até 2012 haviam publicados 18 ensaios clínicos envolvendo a administração de CBD, incluindo estudos de esclerose múltipla (seis estudos), esquizofrenia e mania bipolar (quatro estudos), de ansiedade social (dois estudos), dor neuropática e câncer (dois estudos), câncer e anorexia (um estudo), a doença de Huntington (um estudo), insônia (um estudo) e epilepsia (um estudo) (Zhornitsky and Potwin, 2012).

E ainda existe uma gama de estudos mostrando seu potencial em modelos associados a resposta inflamatória. Evidências de melhora em modelo de diabetes (Wheal et al., 2015), na doença inflamatória intestinal (Doença de Crohn) (Naftali et al., 2014), diminuição da inflamação em modelo de injúria pulmonar (Ribeiro et al., 2012). Assim devido aos seus efeitos benéficos em diversas patologias e sua baixa toxicidade em seres humanos e outras espécies (Rosenkrantz et al; 1981) e seu efeito psicoativo ser observado apenas por via intravenosa (Thakur et al., 2005) o CBD vem sendo amplamente avaliado, e devido a seus efeitos descritos como anti-inflamatório, imunomodulador representa um candidato promissor ao tratamento de asma.

É compreensível que um farmacologista ao observar esta miríade de ações farmacológicas em diversos modelos animais, questione a

possibilidade do uso de tal molécula na clínica. No entanto, é importante ressaltar que o CBD se mostrou extremamente seguro em humanos e vem sendo testado clinicamente, de forma preliminar, para o tratamento de distúrbios de ansiedade, psicose e distúrbios do movimento. Há evidências pré-clínicas que permitem iniciar estudos em humanos no tratamento de diabetes, isquemia, e câncer. Atualmente, um medicamento chamado de Sativex®, a base do CBD e THC, vem sendo comercializado e utilizado na clínica em países como Reino Unido, Espanha, Alemanha, Dinamarca, Nova Zelândia e Canadá. As indicações de Sativex® são: espasticidade em pacientes com esclerose múltipla, dor em pacientes com câncer e dor neuropática, além de outras indicações tais como artrite reumatoide, disfunção urinária, anorexia e caquexia devido ao câncer e AIDS, e náuseas e vômitos em pacientes submetidos a quimioterapia. Desta forma, há evidências substanciais que suportam o aprofundamento de estudo das ações do CBD em outros modelos animais de doenças. (Ribeiro et al., 2015)

Ademais, apesar dos avanços no entendimento da fisiopatologia da asma e da introdução de novas intervenções terapêuticas (Singh et al., 2010; Papierniak et al., 2013) a terapia medicamentosa com corticosteroides, isoladamente ou em associação com agonistas β_2 -adrenérgicos, permanece como a mais efetiva e de primeira escolha para tal doença respiratória (Papierniak et al., 2013). A intervenção anti-inflamatória precoce com corticosteroides minimiza o processo inflamatório característico da asma e pode retardar o desenvolvimento das alterações histológicas e estruturais irreversíveis nas vias aéreas (Miller et al., 2006; Singh et al., 2010), porém não as previne (Chatkin et al., 2003; Boulet et al., 2000; Barnes et al., 2010).

Sabendo que a interação entre as células da resposta imune e o contato com antígenos representa um momento crucial da fisiopatologia de doenças inflamatórias e define a gravidade das manifestações clínicas e da própria sobrevivência ou não do paciente, é de extrema importância um estudo dos mecanismos envolvidos no processo inflamatório e o entendimento de seu equilíbrio com uma resposta imune adaptativa do indivíduo na busca de desenvolver novas estratégias terapêuticas para a asma.

Nesse contexto, como o remodelamento decorre do processo inflamatório, bem como da falta de reparo adequado das vias aéreas, a terapia ideal para a asma deveria atuar simultaneamente sobre ambos os processos. Deste modo, buscamos avaliar o efeito terapêutico do Canabidiol diante de parâmetros inflamatórios e de remodelamento

pulmonar em um modelo animal de asma induzido através de Ovalbumina. Este entendimento faz-se necessário visto que poderá nortear as condutas clínicas no sentido de oferecer uma abordagem terapêutica eficaz em indivíduos com asma, não responsivas às terapias farmacológicas convencionais.

2 OBJETIVOS GERAIS

Determinar se o tratamento com Canabidiol pode atuar na redução da inflamação e do remodelamento e, conseqüentemente, uma melhora funcional em modelo experimental de asma alérgica.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a mecânica respiratória (elastância estática e hiperresponsividade) em animais submetidos ao modelo de asma e tratados com o CBD, ou juntamente com o antagonista de CB1 ou CB2;
- Avaliar os níveis de citocinas no tecido pulmonar e lavado broncoalveolar em animais submetidos ao modelo de asma e tratados com o CBD, ou juntamente com o antagonista de CB1 ou CB2;
- Avaliar a expressão de receptores de canabidiol e metaloproteinases no tecido pulmonar animais submetidos ao modelo de asma e tratados com o CBD, ou juntamente com o antagonista de CB1 ou CB2;
- Confirmar o efeito do CBD em soro de Ratos submetidos ao modelo animal de asma.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Deve-se ressaltar que todos os animais receberam cuidados de acordo com os “Princípios de Cuidados para Animais de Laboratório” formulado pela Sociedade Nacional para Pesquisas Médicas aprovada pelo Conselho da Sociedade Americana de Fisiologia, e todo o projeto será executado dentro das normas estabelecidas pelo COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) para pesquisas utilizando animais. E os mesmos foram aprovados aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa da Universidade antes de sua execução, sob o número de protocolo 02/2011 e 021-2014-02.

3.1 ANIMAIS

Neste estudo foram utilizados Camundongos fêmeas da linhagem Balb/c, com aproximadamente 4 semanas de vida, pesando aproximadamente 25g, acondicionados em 5 por gaiola, procedentes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, para as avaliações de mecânica respiratória (elastância estática e hiperresponsividade), os níveis de citocinas no tecido pulmonar e lavado broncoalveolar e a expressão de receptores de canabidiol e metaloproteínases no tecido pulmonar. Ratos Wistar foram usados para quantificação dos níveis de citocinas em soro, pesando entre 250-300g, acondicionados 5 por gaiola, procedentes da Universidade do Extremo Sul Catarinense. Os animais permaneceram em um ciclo de claro e escuro de 12 horas (06:00 às 18:00) livre acesso a comida e água. O ambiente é mantido a temperatura de $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

3.2 MANIPULAÇÃO DOS ANIMAIS

Durante os experimentos, os animais foram manipulados por pessoas qualificadas para tratar esses animais de maneira humanitária evitando dores e estresse desnecessários a estes animais. Ao final dos experimentos, os animais foram mortos sob estrita obediência às prescrições científicas. Todos os animais durante ou após a realização dos experimentos, receberam cuidados especiais, e não foi aceito qualquer tipo de abuso ou crueldade desnecessária uma vez que o animal é dotado de sensibilidade, de memória e que sofre sem poder escapar da dor. Para isso, os estudos foram realizados de maneira a obter o máximo de informações utilizando-se o menor número possível de animais.

Capítulo I – Avaliações em Camundongos Balb/C

3.3 INDUÇÃO DO MODELO ANIMAL DE ASMA

3.3.1 Sensibilização

Nos grupos asma os animais foram sensibilizados, utilizando-se protocolo sem adjuvante, por meio de sete injeções intraperitoneais de 10 · g de ovalbumina diluída em 0,1 ml de solução salina estéril durante 7 dias alternados. O grupo Controle receberá apenas solução salina.

3.3.2 Desafio Intratraqueal

Quarenta dias após o início da sensibilização, foi realizado o provocação intratraqueal. Para tal, cada animal foi, inicialmente, anestesiado com Sevoflurano inalatório, e sua traqueia foi exposta através de uma incisão longitudinal de 0,5 cm no meio da região cervical. O desafio foi realizado instilando-se 20 · g de ovalbumina diluída em 20 · l de salina estéril, intratraquealmente. Posteriormente, a incisão cervical foi fechada com fio de seda 5.0, e os camundongos depois de recuperados completamente da anestesia, foram colocados em gaiolas individualizadas e microisoladoras. Esse procedimento foi realizado três vezes com intervalo de três dias entre eles. Os grupos controle receberam salina utilizando no mesmo protocolo (Xisto et al., 2005; Abreu et al., 2011).

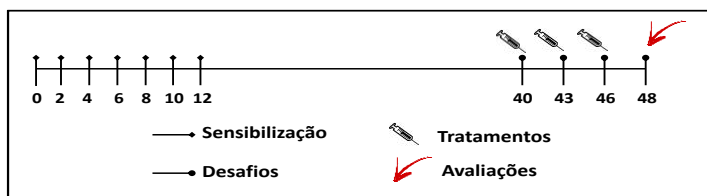


Figura 1: Escala temporal dos procedimentos experimentais

3.4 CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

- 1- Grupo controle (CRTL) – os animais foram sensibilizados e desafiados com solução salina, e foram tratados (no mesmo dia dos desafios) com solução salina por via intraperitoneal (n=10);

- 2- Grupo Asma (OVA) – os animais foram sensibilizados e desafiados com ovalbumina, e foram tratados (no mesmo dia dos desafios) com solução salina por via intraperitoneal (n=10);
- 3- Grupo Asma + CBD (5mg/kg) (OVA5) - os animais foram sensibilizados e desafiados com ovalbumina, e foram tratados (no mesmo dia dos desafios) com solução de CBD diluído em tween 80% por via intraperitoneal na dose de 5mg por kg de peso do animal (n=10);
- 4- Grupo Asma + CBD (10mg/kg) (OVA10) - os animais foram sensibilizados e desafiados com ovalbumina, e foram tratados (no mesmo dia dos desafios) com solução de CBD diluído em tween 80% por via intraperitoneal na dose de 10mg por kg de peso do animal (n=10);
- 5- Grupo Asma + CBD (10mg/kg) + anti-CB1 (AntiCB1)- os animais foram sensibilizados e desafiados com ovalbumina, foram tratados (no mesmo dia dos desafios) com solução de CBD diluído em tween 80% por via intraperitoneal na dose de 10mg por kg de peso do animal, e receberam no mesmo momento do tratamento a administração do antagonista do receptor CB1 (n=10);
- 6- Grupo Asma + CBD (10mg/kg) + anti-CB2 (AntiCB2) - os animais foram sensibilizados e desafiados com ovalbumina, e foram tratados (no mesmo dia dos desafios) com solução de CBD diluído em tween 80% por via intraperitoneal na dose de 10mg por kg de peso do animal, e receberão junto com o tratamento a administração do antagonista do receptor CB2 (n=10);
- 7- Grupo Asma + CBD (10mg/kg) + anti-CB1 e anti-CB2 (AntiCB12) - os animais foram sensibilizados e desafiados com ovalbumina, e foram tratados (no mesmo dia dos desafios) com solução de CBD diluído em tween 80% por via intraperitoneal na dose de 10mg por kg de peso do animal, e receberão junto com o tratamento a administração do antagonista do receptor CB1 e CB2 (n=10).

Após sensibilização e provocação com OVA ou salina, os animais foram avaliados quanto mecânica respiratória, parâmetros inflamatórios, análise histológica e expressão de receptores.

3.5 TRATAMENTOS (Drogas e Doses)

Os animais receberam Canabidiol via intraperitoneal, nos dias em que foram expostos ao desafio intratraqueal com OVA ou salina, antes de submetidos a provocação, e o grupo controle solução salina no mesmo volume.

Quando avaliados com a administração do antagonista de CB1 ou CB2, os animais receberam o antagonista pertinente meia hora antes da administração do CBD conforme descrito na literatura (Hassanzadeh & Rostami, 2014; Mansouri et., al 2014).

- CBD: Canabidiol derivado da *Cannabis sativa* (5mg/kg ou 10 mg/kg – diluído em 2% de tween 80%, em salina preparado no momento da administração e protegidos de luz (Zuardi et al.; 2006).

- AM251: antagonista do receptor CB1 (3mg/kg – diluído em tween 80% e salina) (Hassanzadeh & Rostami, 2014).

- AM630: antagonista do receptor CB2 (3mg/kg – diluído em 2,5% DMSO) (Mansouri et., al 2014).

As soluções foram preparadas imediatamente antes da utilização e foram protegidas da luz durante a sessão experimental.

3.6 MECÂNICA RESPIRATÓRIA

Vinte e quatro horas após o último dia de treinamento, os animais foram sedados com diazepam (1 mg i.p.), em seguida pesados (balança Filizola, modelo BR, fabricada pela indústria Filizola SA, SP, Brasil) e então anestesiados com tiopental [Tiopental sódico (20 mg /Kg i.p)]. Essa dose é o suficiente para manter o animal em plano anestésico (supressão do reflexo córneo-palpebral) por uma hora.

Os animais em plano anestésico foram colocados em uma pequena mesa sob foco cirúrgico em decúbito dorsal, sendo seus membros fixados com esparadrapo. Os membros superiores foram mantidos horizontalmente abduzidos a 90 graus em relação ao corpo, e os membros inferiores estendidos em diagonal. Após o posicionamento cirúrgico, foi realizado traqueostomia com a introdução do jelco 20G com 32 mm de comprimento e 0,8 mm de diâmetro interno, sendo a cânula fixada a traqueia por meio de fio de algodão.

A cânula traqueal do animal foi conectada a um pneumotacógrafo para pequenos animais (Mortola e Noworaj, 1983) para medida do fluxo aéreo (V'). Esse consistiu em uma cânula metálica com duas saídas laterais com as seguintes características: diâmetro interno igual a 1,5

mm, comprimento igual a 4,2 cm e distância entre as saídas laterais igual a 2,1 cm.

A diferença de pressão (P) através do pneumotacógrafo foi determinada utilizando um transdutor diferencial de pressão (UT-PDP-0,2, SCIREQ, Montreal, QC, Canadá). Essa forma de medir fluxo aéreo além de bem simples, é adequada, visto que em animais de pequeno porte, os fluxos e as dimensões traqueais reduzidas são responsáveis pela existência de fluxo laminar e, portanto, o fluxo aéreo pode ser medido de acordo com a lei de Poiseuille, onde a diferença de pressão entre as saídas laterais do pneumotacógrafo é proporcional ao V' . O volume (V_T) mobilizado foi obtido por integração digital do sinal de fluxo.

Através de outra saída lateral, a via aérea foi conectada a outro transdutor diferencial de pressão (UT-PDP-300, SCIREQ, Montreal, Canadá) para medida da pressão traqueal (P_{tr}). A existência de mudanças abruptas no diâmetro do circuito (da traquéia até a extremidade da tubulação) evitará erros de medida de resistência ao fluxo (Chang e Mortola, 1981). O volume corrente (V_T) mobilizado foi obtido por integração digital do sinal de fluxo.

A calibração dos transdutores de pressão foi realizada com o auxílio de um tubo em “U”, contendo água destilada. A aferição foi realizada antes de cada experimento para assegurar a confiabilidade do registro.

O espaço morto da montagem foi de 0,1 mL. Para computá-lo foi pesado o conjunto de equipamentos utilizados entre a via aérea do animal e o ventilador (cânula traqueal, tubo em “T”, pneumotacógrafo e conexões de borracha) vazio e cheio de água. A diferença de peso permitiu saber o volume de água e, portanto, o volume do espaço morto do sistema. Para fechar as saídas do conjunto e enche-lo de água, foi usado massa de modelar, que também foi pesada, junto com os demais equipamentos.

Os animais tiveram sua musculatura paralisada após a administração de brometo de vecurônio (0,005 mg/kg i.v). A ventilação artificial foi instituída por um ventilador mecânico para pequenos animais (Samary VR15, Universidad de La Republica, Montevideu, Uruguai), acoplado à outra extremidade do pneumotacógrafo. O modo instituído foi uma ventilação controlada a volume, com volume corrente (V_T) de 0,2mL e frequência de 100 incursões respiratórias por minuto (irpm). A relação I:E será de 1:2 e a fração inspiratória de oxigênio (FiO_2) de 0,21.

Após a adaptação ao respirador, os animais foram submetidos à incisão cirúrgica por tesoura na linha média no abdômen justo abaixo do

apêndice xifóide. A incisão foi estendida, superficialmente, ao longo da parede torácica sobre o esterno, sendo, então a pele do animal retirada por tração lateral. A seguir, a incisão, a incisão abdominal foi estendida lateralmente, para a esquerda e para a direita, seguindo o bordo inferior das costelas, até atingir a linha axilar anterior, bilateralmente. Com a cavidade abdominal aberta, foi possível visualizar o diafragma, que foi perfurado e seccionado segundo a mesma orientação da abertura da parede abdominal. Imediatamente antes da perfuração do diafragma, foi instalado pressão positiva ao final da expiração (PEEP) de 2 cmH₂O (Saldiva *et al.*, 1992). A utilização da PEEP evitarão colapso alveolar e o desenvolvimento da atelectasia resultante da retirada da parede torácica.

Após a retirada do diafragma, a parede torácica foi removida por três cortes longitudinais bilaterais ao nível da linha axilar anterior, em toda a sua extensão, e corte superior, abaixo da clavícula. O ventilador foi ajustado previamente para gerar, quando desejado, uma pausa de 5 segundo ao final da inspiração. Cuidados forma tomados para a manutenção do volume ($V_T = 0,2$ mL) e do fluxo ($V' = 1$ mL/s) constantes em todos os animais, a fim de evitar os efeitos de diferentes fluxos, volumes e duração da inspiração nas variáveis medidas (Kochi *et al.*, 1998a, 1998 b).

Durante os experimentos foi evitado ao máximo a manipulação da cânula tarqueal com aspirações e insuflações, para eliminar possíveis interferências sobre os parâmetros medidos. No final do experimento, os animais foram sacrificados através da veia cava inferior e aorta abdominal, o que levará a morte sem sofrimento.

3.6.1 Método de oclusão ao final da inspiração

O método de oclusão ao final da inspiração permitiu analisar os componentes elásticos do pulmão (Bates *et al.*, 1985a, 1985b, 1988a, 1988b, 1989; Kochi, 1988a; 1988b).

No animal com o tórax aberto, a pressão traqueal (Ptr) foi, na realidade, a pressão transpulmonar (PL). Após a oclusão das vias aéreas durante cinco segundos ao final da inspiração, sob fluxo constante, ocorreu uma queda súbita da PL até um ponto de inflexão (Pi,L), a partir do qual, o decaimento da pressão assumiu caráter mais lento, atingindo um platô em sua porção terminal. Esta fase de platô corresponde a pressão de retração elástica do pulmão (Pel,L).

O valor da elastância do pulmão (Est,L) foi calculado dividindo-se Pel,L pelo V_T .

A seguinte fórmula foi utilizada na análise da mecânica pulmonar:

$$(1) Est = P_{el}/VT$$

Para a realização da oclusão, o aparelho utilizou uma válvula com tempo de fechamento definido (10 ms). Como esse fechamento não é absolutamente instantâneo, o fluxo nunca cai à zero imediatamente após a oclusão, propiciando, assim, a existência de um pequeno volume. Esse fluxo foi responsável pelo aumento do volume pulmonar e, consequentemente, da $P_{i,L}$ e da $P_{el,L}$.

Foram registrados 10 a 15 ciclos pelo método de oclusão ao final da inspiração em cada animal. Os transdutores conectados ao pneumotacógrafo e ao tubo traqueal registraram os sinais de V' e PL , respectivamente. As respostas de frequências dos sistemas de registro da PL foram consideradas estáveis até 20 Hz. Em seguida, os sinais foram condicionados (SCIREQ, *Scientific Respiratory Equipament Inc.* (SC-24), Montreal, Canadá), filtrados, convertidos a sinais digitais por um conversor analógico-digital de 12-bits (DT-2801A, *Data Translation*, Malboro, EUA) e amostrados a uma frequência de 200 Hz. Os sinais foram armazenados em microcomputadores para posterior análise, através do programa ANADAT (*RHT-InfoData*, Montreal, Canadá) (Figura 2).

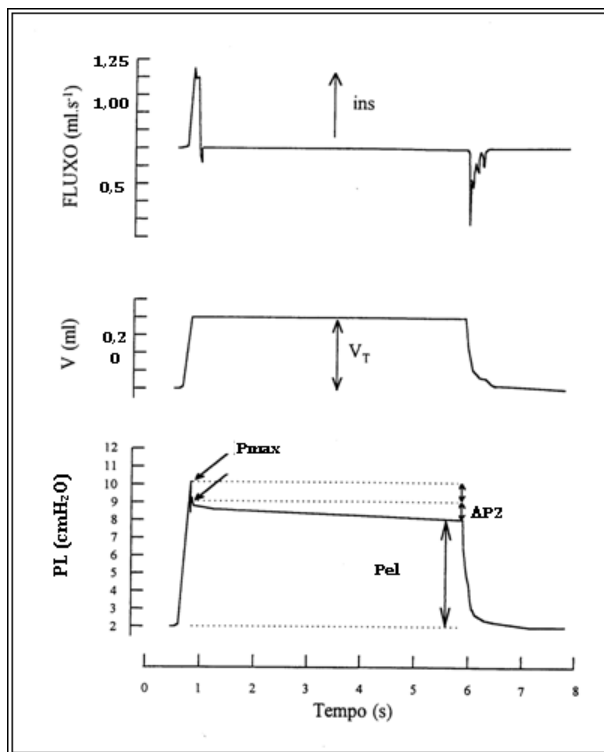


Figura 2: Método de Oclusão ao Final da Inspiração. Registros dos sinais de fluxo aéreo, volume (V) e pressão transpulmonar (PL) em função do tempo. Os pulmões foram ventilados com volume corrente de 0,2 mL e fluxo aéreo de 1 mL/s. O platô foi alcançado após uma pausa inspiratória de 5 s. Após a oclusão das vias aéreas, há uma queda rápida na PL ($\square P1$) que corresponde a $P_{\text{máx}} - P_i$ pressão dissipada para vencer o componente viscoso do pulmão, seguida por uma queda lenta ($\square P2$), pressão dissipada para vencer os componentes viscoelástico e/ou inhomogêneo do pulmão, até um ponto de equilíbrio elástico, representado pela pressão de retração elástica pulmonar (Pel). A linha de base do registro de pressão corresponde à pressão positiva ao final da expiração (PEEP) de 2 cmH₂O.

A resistência total do equipamento (R_{eq}), incluindo a cânula traqueal, foi previamente aferida através da aplicação de fluxo de ar ao sistema (até fluxos de 26 mL/s, bem acima da faixa que será utilizada no presente estudo), com concomitante registro das variações de pressão

(ΔP). Uma vez que $Req = \Delta P/V'$ a resistência do equipamento correspondeu ao coeficiente angular da curva $\Delta P \times V'$. A pressão resistiva do equipamento ($= Req$) foi subtraída da pressão resistiva dos pulmões, da tal forma que os resultados representassem as propriedades mecânicas intrínsecas. A inexistência de mudanças abruptas no diâmetro do circuito (da traqueia até a extremidade do pneumotacógrafo) evitou erros de medidas de resistência ao fluxo (Chang e Mortola, 1981).

3.7 REMOÇÃO DOS PULMÕES

Após a coleta das medidas de mecânica respiratória, o terço inferior do abdômen do animal foi aberto por secção cirúrgica transversal e 1 mL de heparina (2000 U) diluída em 0,8 mL de salina foi injetado na veia cava inferior e após 5 minutos, os animais foram exsanguinados por secção cirúrgica direta da aorta e veia cava inferior em suas porções abdominais. A traqueia foi então ocluída ao final da expiração, com uma PEEP = 2 cm H₂O, com linha de algodão. A porção abdominal do esôfago foi identificada e isolada, sendo presa por uma pinça hemostática. As estruturas do pescoço foram dissecadas com a liberação das vias aéreas.

A pinça que prendeu o esôfago foi suavemente tracionada para cima, permitindo a separação das estruturas aderidas à parede torácica posterior. Com todas as estruturas individualizadas, a traqueia foi secionada acima do local ocluído pelo fio de algodão e, posteriormente, o esôfago e o coração foram separados dos pulmões e as vias aéreas por leve tração, restando apenas os pulmões e as vias aéreas. Os brônquios direito e esquerdo foram ocluídos por um fio de algodão e, após uma seção acima do fio, os pulmões direito e esquerdo foram separados, sendo mantidos no volume expiratório final.

3.7.1 Preparação das Laminas para análise morfométrica

O brônquio fonte esquerdo foi ocluído ao final da expiração, com PEEP de 2 cmH₂O, utilizando-se um fio de algodão. Em seguida o pulmão esquerdo foi resfriado por imersão rápida em nitrogênio líquido (aproximadamente 3 minutos), retirados e mantidos em solução de Carnoy (etanol 60%, clorofórmio 30% e ácido acético 10%) a -70° por 24 horas. Após esse período, o material foi desidratado progressivamente através da imersão em soluções com concentrações crescentes de etanol, como discriminadas abaixo:

- (1) MC-1: etanol 70%, clorofórmio 22,5% e ácido acético 7,5%, a -20°C, durante 1 hora;
- (2) MC-2: etanol 80%, clorofórmio 15% e ácido acético 5%, a -20°C durante 1 hora;
- (3) MC-3: etanol 90%, clorofórmio 7,5% e ácido acético 2,5%, a -20°C durante 1 hora;
- (4) Etanol 100%, a -20°C durante 1 hora, e em seguida a -4°C durante 24 horas.

Posteriormente, o pulmão esquerdo foi mantido a -4°C por 24 h. Após a fixação, o material foi embebido em parafina, obtendo-se cortes histológicos com 4 µm de espessura para análise morfométrica.

3.7.2 Análise morfométrica

As lâminas contendo os cortes pulmonares foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) e analisadas por microscopia óptica (BX51, *Olympus Latin America Inc.*, Miami, Flórida, EUA), segundo seus aspectos qualitativos e quantitativos. Para a análise descritiva, toda a superfície da lâmina foi observada com todas as estruturas pulmonares representadas, em aumento de 200 e 400x.

A análise quantitativa foi realizada através da técnica convencional de contagem de pontos (*point-counting*) (WEIBEL et al., 1990), utilizando-se uma ocular acoplada ao microscópio, contendo um sistema de referência de 100 pontos e 50 segmentos de reta dispostos em paralelo (Figura 3).

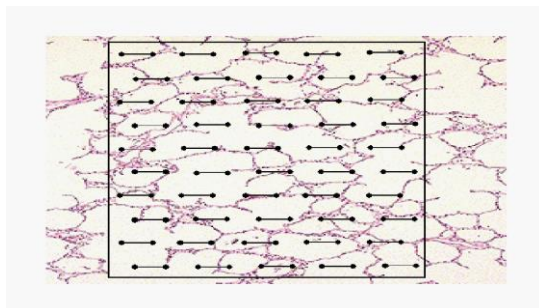


Figura 3 – Retículo com 100 pontos e 50 linhas utilizado para quantificação dos parâmetros morfométricos.

Em um aumento de 200x foram avaliados dez campos aleatórios e não coincidentes por lâmina. As frações de área ocupadas por alvéolos normais e colapsados foram quantificadas. O número de pontos que caíram em área de alvéolo normal ou colapsado foi dividido pelo total de pontos contados em cada campo analisado (normal + colapsado) e expresso sob a forma de percentual. Adicionalmente, em todos os grupos experimentais foram avaliados 10 campos, aleatórios e não coincidentes, por lâmina para quantificação de leucócitos no tecido pulmonar, em um aumento de 1000x, sendo computados: o número de pontos do campo que coincidiam com a área de tecido, células mononucleares e polimorfonucleares, obtendo-se o número de células por área de tecido.

3.8 HIPERRESPONSIVIDADE

A avaliação hiperresponsividade dos camundongos foi realizada através da técnica de pletismografia barométrica de corpo inteiro invasiva (FinePointe™ R/C Buxco; Buxco Electronics, Sharon, CT, EUA). Os camundongos foram previamente anestesiados com pentobarbital de sódio (60 mg/kg, i.p.) e receberam brometo de pancurônio (1 mg/kg, i.v.) para a paralisia da musculatura. Em seguida, os animais foram traqueostomizados para a introdução da cânula e postos em decúbito dorsal em câmara individual, isolada e com leito aquecido (37 °C), preservando a temperatura normal dos animais. A cânula foi conectada ao ventilador respiratório, mantendo constantes o fluxo e o volume de ar. Foi inserido no esôfago do animal um cateter preenchido com água para a captura da pressão esofágica, importante para referência da pressão transpulmonar (Akoumianaki et al., 2014). Completando o sistema, um transdutor ligado à câmara possibilitou que os sinais da pressão transpulmonar e da pressão resultante da diferença de pressão entre o alvo experimental e a câmara de referência fossem transferidos ao *software* BioSystem XA (Buxco Electronics, Wilmington, NC, EUA).

Para avaliar a responsividade das vias aéreas, um nebulizador acoplado ao pletismógrafo permitiu a aerossolização inicial de PBS e posteriormente de doses crescentes e cumulativas de metacolina (Sigma) (3, 9, 27 e 81 mg/mL). A avaliação da resposta à metacolina ocorreu durante 5 minutos, sendo os primeiros 30 segundos referentes ao período de aerossolização desse estímulo broncoconstritor. Foram

obtidas a média dos valores absolutos provenientes dos parâmetros de complacência e resistência. Os períodos de broncoprovocação foram espaçados por 5 min de estabilização.

3.9 NÍVEIS DE CITOCINAS

Os níveis de citocinas foram mesurados por meio de painel específico para IL-4, IL-5, IL-9, e eotaxina específico para camundongo, baseado na tecnologia Luminex.

Luminex utiliza técnicas de coloração fluorescente codificada de microesferas através de concentrações específicas desses corantes, as esferas são revestidas com o anticorpo de captura específico. Sendo que processadores de sinais digitais de alta velocidade identificam cada microesfera individual e quantificam o resultado.

3.10 EXPRESSÃO DE RECEPTORES CB1, CB2 E METALOPROTEINASES

O nível protéico de CB1, CB2, MMP-2 e MMP-9 foram mensurados por *Western blotting* utilizando anticorpos específicos (ABCAM®). Para executá-lo as amostras foram homogeneizadas em tampão Laemmli (62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 1% (w/v) de dodecil sulfato de sódio (SDS), 10% (v/v) de glicerol) e quantidades iguais de proteína foram fracionados por eletroforese em gel de poliacrilamida - dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose. A eficiência da eletrotransferência foi verificada por meio de coloração Ponceau S, e a membrana foram bloqueadas em Tampão Tween-Tris salina (TTBS: 100 mM Tris-HCl, pH 7,5 contendo 0,9% de NaCl e 0,1% de Tween 20) com 5% de albumina. As membranas foram incubadas *overnight* a 4°C com anticorpo policlonal de coelho para CB1 e CB2 e anticorpo policlonal de camundongo para MMP-2 e MMP-9 (1:1000). Anticorpo secundário Anti-IgG de coelho e camundongo foi incubado com as membranas durante 2 horas (1:10000), a membrana foi lavada novamente com TTBS, e a imunorreatividade foi detectada por quimioluminescência amplificada utilizando ECL. A análise densitométrica dos filmes foi realizada com o software Image J® v.1.34. Todos os resultados foram expressos como uma razão relativa entre CB1, CB2, MMP-2 e MMP-9 e o imunoc conteúdo de proteína β -actina.

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O programa estatístico GraphPad Prism 5.0 (Graph Pad Software, Inc.) foi utilizado nas análises estatísticas. Dados paramétricos foram analisados por ANOVA de uma via seguido pelo teste de comparações múltiplas Tukey-Kramer. Dados não paramétricos foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de comparações múltiplas Dunn.

Em todos os experimentos um $p \leq 0.05$ foi considerado significativo. Dados estão apresentados como média \pm desvio padrão.

Capítulo II – Avaliações em Ratos Wistar

3.12 INDUÇÃO DO MODELO ANIMAL DE ASMA

Para indução do modelo animal, utilizou-se o protocolo descrito previamente por Zhou e colaboradores (2015) ilustrado na figura 4. Os ratos foram imunizados IP com 10 μ g de Ovalbumina, em 100 μ l de sulfato de alumínio. Após 14 dias, os ratos foram estimulados com OVA ou semente de Alúmenos nos grupos não tratados. Sete dias mais tarde, os ratos receberam desafios de aerossol (30 min / durante 3 d) com 1% de OVA ou salina (Zhou et al., 2015).

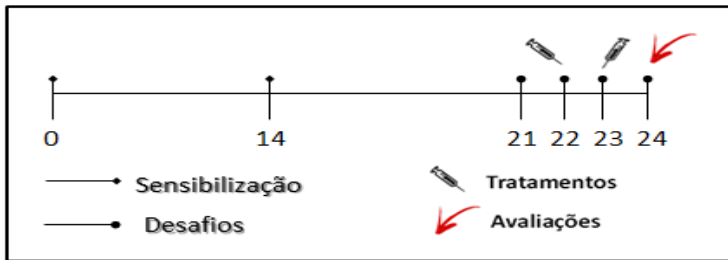


Figura 4: Escala temporal dos procedimentos experimentais

Para o tratamento, o CBD foi administrado intraperitoneal, nos últimos dois dias de nebulização, nas doses de 5 mg/kg de (Zuardi, 2006). Para essa avaliação foram usados 21 ratos, que foram divididos aleatoriamente em três grupos, como descritos abaixo:

- Veículo (CRTL) (n = 7);
- OVA + Veículo (Controle da asma) (n = 7);
- OVA + CBD (Tratamento da asma +) (n = 7).

Vinte e quatro horas após o ultimo desafio os animais foram mortos e o sangue obtido e centrifugado para posterior avaliação dos níveis de citocinas em soro.

3.13 NÍVEIS DE CITOCINAS

Os níveis de citocinas em soro de Ratos Wistar foram avaliados através de painel específico Luminex para as citocinas IL-4, IL-5, IL-13, IL-6, IL-10, TNF- α .

3.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O programa estatístico SPSS 17.0 (SPSS, Chicago, IL) foi utilizado nas análises estatísticas. Dados paramétricos foram analisados por ANOVA de uma via seguido pelo teste de comparações múltiplas Tukey-Kramer. Em todos os experimentos um $p \leq 0.05$ foi considerado significativo. Dados estão apresentados como média \pm desvio padrão.

4 RESULTADOS

4.1 FUNÇÃO PULMONAR

Inicialmente foi avaliada a responsividade das vias aéreas de camundongos através da administração de doses crescentes e cumulativas de metacolina. Como esperado, pode-se observar aumento da resistência ao fluxo em animais induzidos a asma (grupo OVA). Esse efeito foi revertido com uso de CBD nas duas doses empregadas. O efeito do CBD parece ser mediado pelo receptor CB1, uma vez que a administração de AntiCB1 deixa os animais tratados mais suscetíveis ao efeito da metacolina (Figura 5).

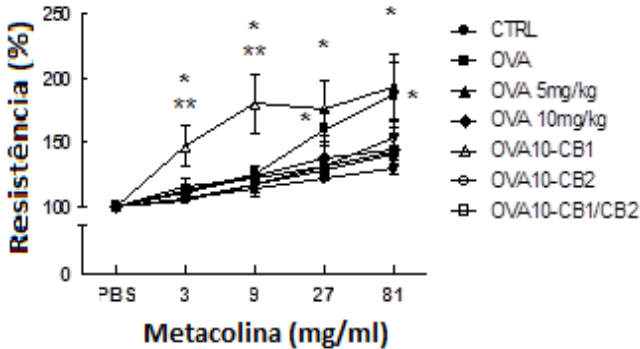


Figura 5: Porcentagem de aumento da resistência das vias aéreas após injeção de doses crescentes de metacolina em relação à dose controle (salina). *Significativamente diferente do grupo CTRL **Significativamente diferente do grupo OVA ($p < 0,05$). Análise de variância de duas vias (ANOVA) seguido do teste Tukey de comparações múltiplas.

Quando foi avaliada a elastância estática observamos um aumento significativo comparando o grupo OVA ao grupo CTRL. Este efeito é revertido pela dose de 10 mg/kg sendo este efeito dependente da ativação de ambos receptores 1 e 2 (Figura 6).

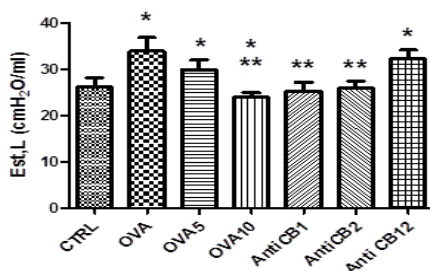


Figura 6: Elastância estática no pulmão de camundongos expostos ao modelo animal de asma e tratados com o CBD. *Significativamente diferente do grupo CTRL, ** Significativamente diferente do grupo OVA ($p < 0,05$). Análise de variância de duas vias (ANOVA) seguido do teste Tukey de comparações múltiplas.

4.2 MORFOMETRIA PULMONAR

Os animais do grupo OVA apresentaram um aumento significativo na área de colapso alveolar quando comparados com o grupo CTRL, sendo que o tratamento com o CBD 10mg/kg reduziu significativamente tais alterações no parênquima pulmonar (Tabela 1). Adicionalmente, apresentaram um aumento estatisticamente significativo no número de células polimorfonucleares (PMN) por área de tecido quando comparados com o grupo CTRL. A administração de CBD na dose de 10mg/kg reduziu o número de tais células (Tabela 2). Nenhum destes efeitos protetores do CBD foram revertidos com uso de antagonista CB1 ou CB2.

Tabela 1: Alvéolos normais e colapsados

Grupos	Normal (%)	Colapso (%)
CTRL	94.8+/-1.09	5.14+/- 1.09
OVA	72.2+/- 0.98*	27.7+/- 0.98*
OVA5	77.7+/- 1.82*	22.3+/- 1.82
OVA10	86.0+/- 1.56* ** #	13.9+/- 1.56* **
AntiCB1	82.3+/- 1.14* **	17.6+/-1.14* **
AntiCB2	84.4+/- 1.14* **	15.5+/- 1.14* **
AntiCB12	70.6+/- 6.14* ** †	20.9+/- 2.09* **

Tabela 1: Frações de área de alvéolos normais e colapsados no parênquima pulmonar. *Significativamente diferente do grupo CTRL, **Significativamente diferente do grupo OVA ($p < 0,05$).). #Significativamente diferente dos grupos somente tratados com CBD5. †Significativamente diferente dos grupos somente tratados com CBD10. Análise de variância de duas vias (ANOVA) seguido do teste Tukey de comparações múltiplas.

Tabela 2: Número de células no tecido pulmonar

Grupos	MN (%)	PMN (%)	Total (%)
CTRL	16.08 \pm 4.68	1.92 \pm 0.88	17.99 \pm 4.47
OVA	16.49 \pm 4.28	9.08 \pm 1.65 *	25.57 \pm 4.03
OVA5	18.85 \pm 2.15	5.29 \pm 2.58 *	24.14 \pm 2.70
OVA10	19.47 \pm 1.62	3.15 \pm 1.78 * **	22.62 \pm 2.40
AntiCB1	19.17 \pm 2.44	4.57 \pm 0.95 * **	23.74 \pm 2.27
AntiCB2	21.54 \pm 3.35	3.14 \pm 1.05 * **	24.69 \pm 3.28
AntiCB12	27.56 \pm 4.88 *	4.86 \pm 1.73 * **	32.42 \pm 5.04 *

Tabela 2: Razão do número de células polimorfonucleares (PMN), mononucleares (MN) e totais (TOT) por área de tecido no parênquima pulmonar. *Significativamente diferente do grupo CTRL, ** Significativamente diferente do grupo OVA ($p < 0,05$).

4.3 INFLAMAÇÃO PULMONAR

Avaliamos os níveis de 5 citocinas (IL-4, IL-5, IL-13, IL-9, e eotaxina) envolvidas no processo inflamatório característico da asma medidas tanto no pulmão quanto no LBA. A exposição a OVA efetivamente leva aumento de citocinas inflamatórias quando comparamos com o grupo controle para IL-4 (Figura 7) IL-5 (Figura 8) IL-13 (Figura 9) e eotaxina (Figura 10), IL-9 (Figura 11). De uma maneira geral as duas doses administradas de CBD diminuíram os níveis das citocinas estudadas (Figura 7-11). A administração dos antagonista de CB1 e CB2 juntos, conseguiram reverter esse efeito nos níveis de IL-4, IL-5 e IL-13 no LBA desses animais e separadamente reduziram os níveis de eotaxina também no LBA dos animais.

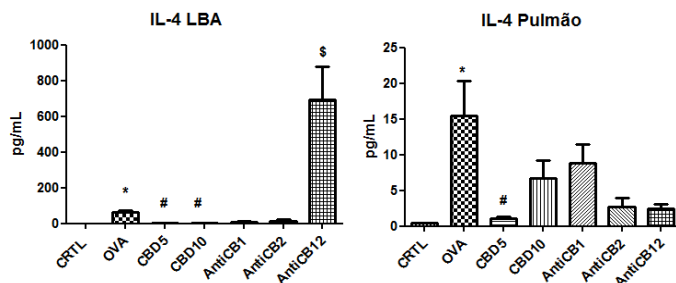


Figura 7: Níveis de citocina IL-4 em LBA e pulmão de camundongos expostos ao modelo animal de asma e tratados com o CBD. *Significativamente diferente do grupo CTRL. #Significativamente diferente do grupo OVA ($p < 0,05$). \$Significativamente diferente dos grupos somente tratados com CBD. Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn de comparações múltiplas.

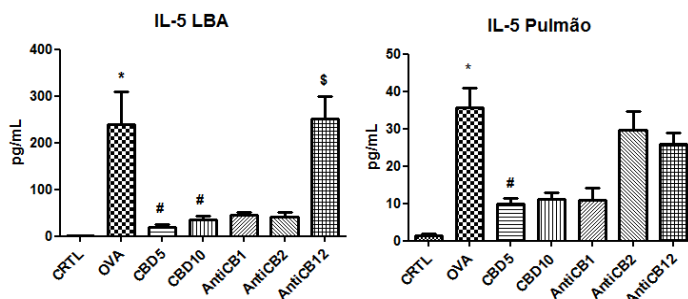


Figura 8: Níveis de citocina IL-5 em LBA e pulmão de camundongos expostos ao modelo animal de asma e tratados com o CBD. *Significativamente diferente do grupo CTRL. #Significativamente diferente do grupo OVA ($p < 0,05$). \$Significativamente diferente dos grupos somente tratados com CBD. Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn de comparações múltiplas.

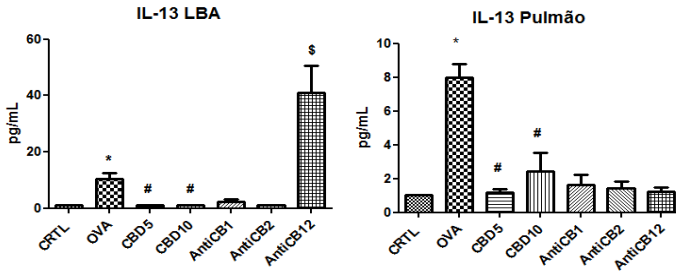


Figura 9: Níveis de citocina IL-13 em LBA e pulmão de camundongos expostos ao modelo animal de asma e tratados com o CBD. *Significativamente diferente do grupo CTRL. #Significativamente diferente do grupo OVA ($p < 0,05$). Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn de comparações múltiplas.

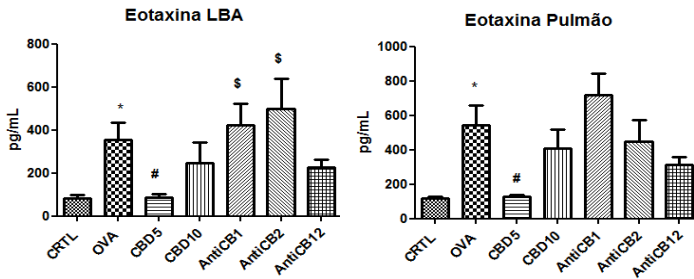


Figura 10: Níveis da quimiocina eotaxina em LBA e pulmão de camundongos expostos ao modelo animal de asma e tratados com o CBD. *Significativamente diferente do grupo CTRL. #Significativamente diferente do grupo OVA ($p < 0,05$). \$Significativamente diferente dos grupos somente tratados com CBD. Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn de comparações múltiplas.

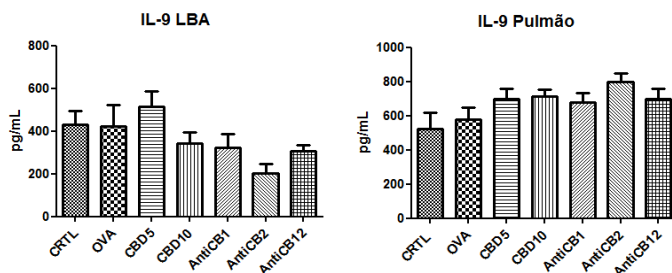


Figura 11: Níveis da IL-9 em LBA e pulmão de camundongos expostos ao modelo animal de asma e tratados com o CBD. *Significativamente diferente do grupo CTRL. #Significativamente diferente do grupo OVA ($p < 0,05$). \$Significativamente diferente dos grupos somente tratados com CBD. Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn de comparações múltiplas.

Quando avaliamos os níveis inflamatórios em soro de Ratos wistar expostos a Ovalbumina, dividimos essas citocinas em perfil Th1 (TNF- α e IL-6) e Th2 (IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13) observamos que em todos os grupos OVA ocorreu um aumento significativo em relação ao CTRL e o tratamento com o CBD 5mg/kg foi capaz de reduzir esses níveis nos animais tratados (Figura 12 e figura 13).

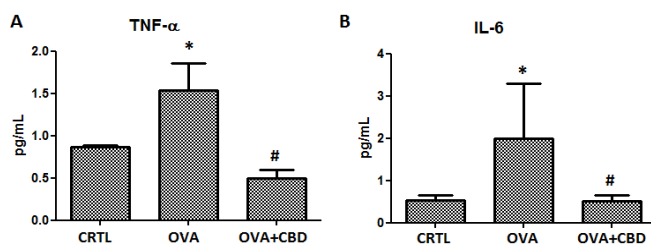


Figura 12: Expressão de citocinas com perfil TH1 em Ratos Wistar expostos ao modelo asma por Ovalbumina. A= Níveis de TNF- α ; B= IL-6. *Significativamente diferente do grupo CTRL, # Significativamente diferente do grupo OVA ($p < 0,05$). Análise de variância de duas vias (ANOVA) seguido do teste Tukey de comparações múltiplas.

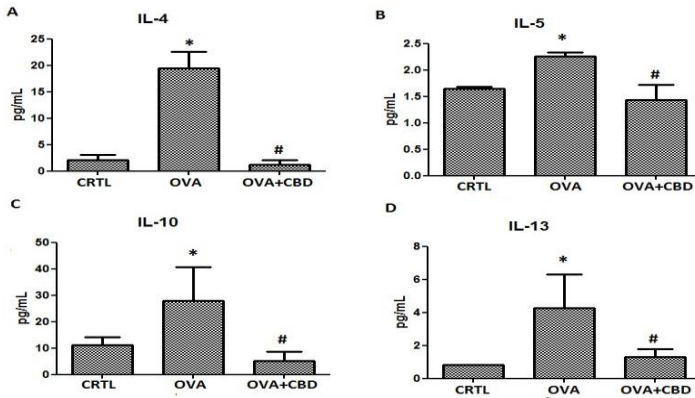


Figura 13: Expressão de citocinas com perfil TH2 em Ratos Wistar expostos ao modelo asma por Ovalbumina. A= Níveis de IL-4; B= Níveis de IL-5; C= Níveis de IL-10; D= Níveis de IL-13. *Significativamente diferente do grupo CTRL, # Significativamente diferente do grupo OVA ($p < 0,05$). Análise de variância de duas vias (ANOVA) seguido do teste Tukey de comparações múltiplas.

Quando avaliamos a expressão das metaloproteinases MMP-2 e MMP-9, e dos receptores de CB1 e CB2 no pulmão de camundongos expostos a OVA, não verificamos diferença significativa estatisticamente (Figuras 14 e 15).

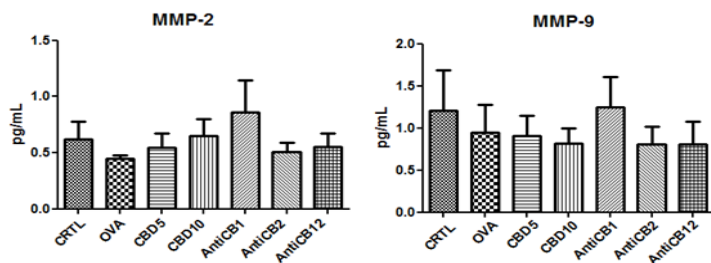


Figura 14: Expressão de metaloproteínas MMP-2 e MMP-9 no pulmão de camundongos expostos ao modelo animal de asma e tratados com o CBD. Análise de variância de duas vias (ANOVA) seguido do teste Tukey de comparações múltiplas.

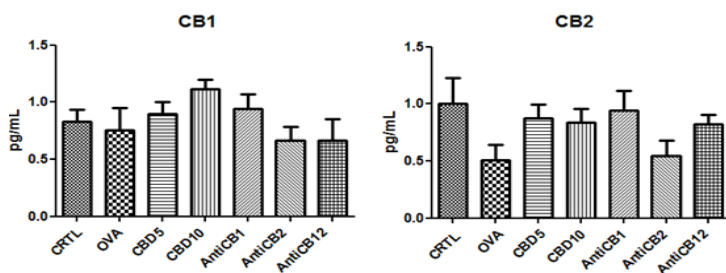


Figura 15: Expressão dos receptores CB1 e CB2 no pulmão de camundongos expostos ao modelo animal de asma e tratados com o CBD. Análise de variância de duas vias (ANOVA) seguido do teste Tukey de comparações múltiplas.

5 DISCUSSÃO

O presente trabalho investigou os efeitos do tratamento com o canabidiol em modelo murino de inflamação alérgica crônica das vias aéreas e evidenciou que o mesmo foi eficiente em minimizar o processo inflamatório e as alterações estruturais que caracterizam o processo de remodelamento da asma. Esses efeitos parecem ser mediados tanto por interação com receptores CB, quanto independentes deles.

Ribeiro e colaboradores em 2015 mostraram que o tratamento profilático com o CBD foi capaz de produzir uma diminuição prolongada em diversos parâmetros inflamatórios, tais como a migração de leucócitos (neutrófilos, macrófagos e linfócitos) para os pulmões, atividade de MPO no tecido pulmonar, produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias no LBA e permeabilidade vascular em um modelo de injúria pulmonar aguda induzida por LPS (Ribeiro et al., 2015). Apesar de se tratar de uma resposta inflamatória diferente da observada no modelo de asma isto reforça nossos resultados quando observamos um efeito anti-inflamatório do canabidiol diminuindo citocinas características da asma.

As citocinas desempenham um papel crítico no desenvolvimento da inflamação crônica em diversas doenças, incluindo a asma (Chung & Barnes, 1999) o que leva a uma busca intensiva para terapias mais específica à doença, e inibidores de citocinas e quimiocinas, tornam-se figuras chaves nessa nova abordagem terapêutica (Barnes, 2000).

Os linfócitos Th2 desempenham um papel chave na resposta eosinofílica durante a resposta inflamatória na asma, o que sugere que o bloqueio ou efeito destas citocinas possam ter um potencial terapêutico (Barnes, 2000). Neste sentido se enfatiza, no processo de inflamação da asma, a secreção de IL-4, IL-5 e IL-13. Estas citocinas são particularmente importantes por estarem envolvidas na resposta imune tardia (Bousquet et al., 2000). Célula T, IgE e citocinas IL-4 e IL-5 tem papel fundamental no início e sustentação da resposta em asmáticos por regular o recrutamento e/ou ativação de mastócitos e eosinófilos na via aérea (Foster et al., 1997). Assim, os efeitos apresentados aqui pelo CBD parecem particularmente importantes. Agentes biológicos específicos para cada uma destas citocinas já se encontram em uso / testes clínicos com efeitos promissores. Portanto, uma molécula que possua efeito antagonista ao destas citocinas centrais da resposta asmática pode ser relevante no futuro tratamento destes pacientes.

Além disto, antes que a resposta Th2 seja iniciada, linfócitos T CD4+ auxiliares (em inglês *helper*) se subdividem em duas categorias fenotípicas, Th1 e Th2, e o fator determinante para essa diferenciação pode estar relacionado à ação das citocinas do ambiente circulante do linfócito. A IL-4 apresenta esse tipo de característica, proveniente de mastócitos, basófilos, células natural killer como já mencionado, estimulando linfócitos a desenvolverem um padrão Th2 com expressão de citocinas IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, e IL-25. Além disto, a IL-4 parece ser um mediador fundamental para que os linfócitos T iniciem a produção de IL-5. (Humbert et al., 1996; Kotsimbos et al., 1996; Ying et al., 1997). Quando medimos os níveis de IL-4 em animais submetidos à exposição de OVA e tratados com o CBD, esses valores foram significativamente diminuídos, tanto em pulmão e LBA de camundongos, como em soro de ratos (Figura 7 e Figura 13). Essa diminuição pode estar envolvida na redução da liberação de outras citocinas presentes na resposta inflamatória na asma. Estudos realizados por meio de biópsia brônquica evidenciaram ao nível do epitélio e subepitélio respiratório o aumento na expressão da IL-4, tanto sob a forma proteica como sob a forma de mRNA, em pacientes com asma atópica e não-atópica (Humbert et al., 1996; Kotsimbos et al., 1996; Ying et al., 1997).

Existe uma forte evidência do papel da IL-5 na asma, por ser essencial no mecanismo de maturação do precursor de eosinófilos na medula óssea, e estes eosinófilos se acumulam no pulmão durante um processo inflamatório pulmonar (Tae et al., 2012). A asma brônquica é caracterizada por uma inflamação eosinofílica da mucosa brônquica. A IL-5 está implicada principalmente no desenvolvimento desta inflamação porque promove o crescimento, maturação, migração, infiltração local, ativação e sobrevida dos eosinófilos. A concentração de IL-5 em soro de pacientes com asma sintomática é diminuída com terapia de corticoides orais (Egan et al., 1996; Lalani et al., 1999). Assim um interesse particular tem sido dado ao estudo da IL-5 devido a sua eminente importância no controle da função de eosinófilos.

Experimentos *in vitro*, tem demonstrado que a IL-5, aumenta a adesão do eosinófilo na célula epitelial, aumenta o número de eosinófilos remanescentes, estimula eosinopoiese e aumenta a atividade citotóxica do eosinófilo (Egan et al., 1997). Assim, quando administramos o CBD como tratamento em animais submetidos ao modelo de asma, podemos observar uma diminuição significativa nos níveis de IL-5 (Figura 8 e Figura 13). Aliado ao efeito sobre a IL-4, isto demonstra um potencial

terapêutico para a inflamação da asma. Recentemente, eosinófilos tem sido referido na síntese e armazenamento de uma série de proteínas reguladoras em seus grânulos secretores (eosinas). Estes mediadores são citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento (Lacy & Mogbel, 1997). Acredita-se então, que os eosinófilos têm um importante papel nas respostas inflamatórias das vias aéreas, e a eosinofilia do tecido é uma característica da via aérea de asmáticos, portanto, os eosinófilos têm sido demonstrados como causadores da injúria da mucosa e provavelmente contribui para alterações fisiológicas do pulmão, isso pode estar envolvido na diminuição de células polimorfonucleares observada nos animais (Tabela 2).

A IL-13 é considerada um dos fatores estimulantes da hipersecreção de muco na asma (Park et al., 2009). A hipersecreção é uma característica importante na asma brônquica, contribuindo para exacerbação da doença (DiGiovanni et al., 2009). O bloqueio da IL-13 em camundongos preveniu o desenvolvimento de hiperreatividade das vias aéreas, produção de muco, e inflamação das vias aéreas, durante a indução de asma (Wills-Karp et al., 1998), reforçando a importância da IL-13, sua expressão foi suficiente para aumentar a hiperresponsividade e metaplasia de muco, um aumento na produção de quimiocinas e inflamação das vias aéreas (Zhu et al., 1999; Kuperman et al., 2002). Em nosso estudo, quando analisamos os níveis de IL-13 podemos perceber uma redução em seus níveis (Figura 9 e Figura 13). Isso está de acordo com estudos que usaram um antagonista do receptor IL-4R α , resultando em uma prevenção significativa na resposta induzida pelo alérgeno (Wenzel et al., 2007), e uma redução nos sintomas de pacientes com asma (Corren et al., 2011).

Vindo ao encontro de todos esses achados de citocinas envolvidas na resposta inflamatória na asma, a IL-6 ainda estimula a proliferação de tímócitos e linfócitos T, aumentando a produção de IgE dependente da IL-4, e mediando a diferenciação de células B. Níveis de IL-6 estão aumentados no escarro e na circulação sistêmica de pacientes com asma severa, esta pode ser uma das responsáveis pelo aumento dos níveis circulantes de proteína C reativa nestes pacientes (Van Snick, 1990). E os níveis de IL-6 também estiveram diminuídos em soro de ratos quando administramos CDB nos animais (Figura 12). Seguindo ainda um perfil pró-inflamatório, existem também vários estudos, que sugerem que o TNF- α se constitua em um importante mediador inflamatório na asma severa. Duas modalidades terapêuticas utilizam esta nova via, utilizando os TNFRs solúveis recombinantes e anticorpos monoclonais contra o

TNF- α . Os TNFRs solúveis recombinantes mimetizam a atividade dos TNFRs naturais e quando de sua ligação com o TNF previnem a interação com o TNFR da membrana celular (Schawingshackl et al., 1999; Erzurum, 2006). E podemos observar em nossos resultados que o CBD teve o perfil de diminuir a liberação de TNF- α em ratos submetidos ao modelo de asma, reforçando seu perfil anti-inflamatório (Figura 12).

Avaliamos essas citocinas envolvidas na resposta inflamatória na asma e observamos a modulação que o CBD provocou. Reforçando seu efeito anti-inflamatório trabalhos mostram que ele provoca uma diminuição na migração de leucócitos para os pulmões em um modelo de lesão pulmonar aguda (Ribeiro et al., 2012). Ribeiro e colaboradores também mostraram no mesmo estudo que o CBD diminui a atividade da mieloperoxidase, e a produção de quimiocinas, como a MCP-1 e MCP-2 (Ribeiro et al., 2012). Nos observamos a diminuição da eotaxina descrita como um agente quimiotático específico para eosinófilos (Figura 10). Após a provocação alérgica, a expressão da eotaxina correlaciona-se com o número total de eosinófilos e de eosinófilos ativos bem como o nível de obstrução das vias aéreas de pacientes com asma (Lacy & Moqbel, 2001).

Além das células inflamatórias recrutadas, elementos mesenquimais como fibroblastos e miofibroblastos que estão aumentados em indivíduos asmáticos (GIZYCHKI et al., 1997), parecem desempenhar importante papel na manutenção do processo inflamatório e de remodelamento da asma. Tais tipos celulares são capazes de produzir citocinas, fatores de crescimento, além de diversos componentes da matriz extracelular (MEC), tais como: fibras colágenas, elásticas e reticulares, laminina, fibronectina, proteoglicanos e glicosaminoglicanos. O que pode estar envolvido na diminuição da elastância estática encontrada nos animais tratados com o CBD (Figura 6), dependente da diminuição celular observada (Tabela 2). Deste modo, fica evidente as células inflamatórias contribuem para os processos de fibrose subepitelial e peribrônquica característicos da asma (MORISHIMA et al., 2001).

Na busca de desvendar qual o mecanismo que leva o CBD exercer este potente efeito anti-inflamatório, muito vem se especulando a respeito. Cunha e colaboradores (1980) mencionaram a possível ativação dos receptores canabinóides (CB1 e CB2) localizados no SNC e células imunes para explicar seu efeito como anti-inflamatório e analgésico (Cunha et al., 1980), nos não observamos alterações na

expressão desses receptores no pulmão dos animais utilizados nesse modelo (Figura 11), mas muito ainda deve ser investigado, como a expressão destes em células imunes, ou no musculo liso das vias aéreas. Entretanto podemos observar em alguns resultados que quando os animais receberam o antagonista de CB1 ou CB2, ocorreu a reversão de alguns parâmetros, como os níveis de IL-4, IL-5 e IL-13. Em animais que receberam antagonistas de CB1 e CB2 juntos obtiveram seus níveis novamente aumentados, ou ainda a quimiocina eotaxina que teve o mesmo perfil, mas na administração dos antagonistas separadamente.

Contudo, recentemente pesquisadores usaram um inibidor do receptor de adenosina A2A, no modelo de inflamação pulmonar, e observaram um possível envolvimento na potencialização do efeito de CBD inibindo tal receptor (Ribeiro et al., 2012); o CBD possui um amplo espectro de ações farmacológicas (Mechoulam et al., 2002; Zuardi, 2008), incluindo a inibição de um transportador de nucleosídeo, que por sua vez conduz ao aumento de adenosina extracelular (Carrier et al., 2006). Izzo e colaboradores acreditam que o aumento na sinalização de adenosina possa ser o principal mecanismo pelo que o CBD diminui a inflamação (Izzo et al., 2009).

Outra possível interação do canabidiol seria com os receptores TRPV, um modelo de inflamação no fígado através da injeção de conca valina, que resulta na ativação de linfócitos T o CBD foi capaz de reduzir a resposta inflamatória, e os autores mostraram que essa supressão induzida é dependente de TRPV1 (Hegde et al., 2011), e o canal de TRPV4 funcional é expresso em fibroblastos humanos e no pulmão de murinos, e ratos são protegidos de fibrose pulmonar através de inibição desses canais (Rahaman et al., 2014).

Clinicamente, existem diversos fatores que acabam por limitar o estudo da fisiopatologia da asma humana, tais como: variabilidade no fenótipo clínico, influências ambientais não-controladas e heterogeneidade genética da população estudada (Kips et al., 2003). Deste modo, diversos modelos murinos de asma alérgica têm sido extremamente úteis na avaliação dos mecanismos de inflamação alérgica e da consequente resposta imunológica (Fulkerson et al., 2005), proporcionando o teste de diferentes terapias farmacológicas, antes de serem usadas em estudos clínicos. Uma grande variedade de animais, incluindo camundongos, ratos, cachorros, ovelhas, macacos e cavalos têm sido utilizados para estudar o processo inflamatório, as alterações da função pulmonar e o remodelamento tecidual. No entanto, a maioria dos estudos de doenças alérgicas das vias aéreas vem sendo realizada em

camundongos. Entretanto, o fato de que a estrutura pulmonar dos camundongos difere do humano é uma limitação importante em modelos de asma em camundongos (Hyde et al., 2009). Portanto, embora nenhum modelo de asma em camundongo reproduza totalmente suas manifestações clínicas, muitos manifestam diversas modificações inflamatórias, funcionais e histológicas sugestivas de remodelamento da via aérea, mimetizando o que encontramos na asma (Xisto et al., 2005).

Nesse estudo foi utilizado modelo murino de asma alérgica crônica no qual os camundongos foram cronicamente sensibilizados intraperitonealmente e desafiados com ovalbumina intratraquealmente e não via instilação nasal (Hayashi et al., 2005; Chew et al., 2008) ou aerosol (Zosky et al., 2007; Mayuzumi et al., 2007) como usualmente realizado. A introdução do alérgeno diretamente nas vias aéreas evita sua deposição gástrica e assegura a instilação da mesma quantidade do alérgeno (Xisto et al., 2005; Busse et al., 2007; Silva et al., 2008), reduzindo de tal maneira a variabilidade da resposta inflamatória e do remodelamento das vias aéreas entre os diferentes animais. Esse modelo, descrito por Xisto e colaboradores, apesar de crônico, visto que protocolos crônicos podem levar a tolerância ao alérgeno, reproduz diversas características da asma humana, tais como: desnudação epitelial, infiltração e ativação de eosinófilos, macrófagos e linfócitos T no lúmen e mucosa das vias aéreas e hipertrofia e hiperplasia de células musculares lisas e glândulas mucosas (Xisto et al., 2005).

A facilidade de acesso direto ao epitélio das vias aéreas através de técnicas inalatórias, o fato de a asma ser uma doença caracterizada por um processo inflamatório crônico com desequilíbrio entre mediadores anti- e pró-inflamatórios, e as limitações das terapias atualmente disponíveis para o tratamento da asma fazem dessa doença um alvo para novas alternativas de tratamento, como o canabidiol. Nesse contexto, o canabidiol, pode vir a ser um forte candidato para tratamento da inflamação alérgica crônica, diante da diminuição da inflamação observada e consequentemente melhorando o processo de remodelamento nas vias aéreas.

6 CONCLUSÃO

Em conclusão, o presente estudo demonstrou a capacidade do tratamento com o canabidiol em minimizar o processo inflamatório e em reduzir as citocinas relacionadas ao processo de remodelamento. Sugerimos então que a administração do CBD durante a exposição pode diminuir tais níveis de citocinas, controlando essa resposta inflamatória exacerbada, e consequentemente melhorando o processo de remodelamento nas vias aéreas podendo assim ser um potencial terapêutico. Ainda assim, há uma longa busca para descobrir por qual mecanismo o CBD exerce seu potente efeito anti-inflamatório, levando-nos a questionar, se caso essa terapia fosse administrada por um longo período, se teríamos os mesmos benefícios encontrados no presente trabalho. Gerando dessa forma, a necessidade da realização de mais estudos para avaliar se essa terapia pode ser realmente estendida para a prática clínica.

7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abreu SC, Antunes MA, Maron-Gutierrez T, Cruz FF, Carmo LG, Ornellas DS, Junior HC, Absaber AM, Parra ER, Capelozzi VL, Morales MM, Rocco PR. Effects of bone marrow-derived mononuclear cells on airway and lung parenchyma remodeling in a murine model of chronic allergic inflammation. *Respir Physiol Neurobiol.* 2011; 175(1):153-163.

Adams R, Hunt M, Clarck JH. Structure of cannabidiol, a product isolated agents. *J Pharm Pharmacol.* 1973; 25: 664-665.

Ahmed SA, Ross SA, Slade D, Radwan MM, Zulfikar F, Elsohly MA. Cannabinoid Ester Constituents from High-Potency *Cannabis sativa*. *Journal of Natural Products.* 2008; 71: 536-542.

Akoumianaki E, Prinianakis G, Kondili E, Malliotakis P, Georgopoulos D. Physiologic comparison of neurally adjusted ventilator assist, proportional assist and pressure support ventilation in critically ill patients. *Respir Physiol Neurobiol.* 2014; 1(203):82-89.

Al Mansouri S1, Ojha S2, Al Maamari E1, Al Ameri M1, Nurulain SM2, Bahi A3. The cannabinoid receptor 2 agonist, β -caryophyllene, reduced voluntary alcohol intake and attenuated ethanol-induced place preference and sensitivity in mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 2014; 3: 260-268.

Anderson GP. Endotyping asthma: new insights into key pathogenic mechanisms in a complex, heterogeneous disease. *Lancet.* 2008; 8: 372: 1107-1119.

Anderson GP. The immunobiology of early asthma. *Med J.* 2002; 177: 47-49.

Antunes MA, Abreu SC, Silva AL, Parra-Cuentas ER, Ab'Saber AM, Capelozzi VL, Ferreira TP, Martins MA, Silva PM, Rocco PR. Sex-specific lung remodeling and inflammation changes in experimental allergic asthma. *J Appl Physiol*. 2010; 3: 855-863.

Atwood BK, Mackie K. CB2: a cannabinoid receptor with an identity crisis. *Br J Pharmacol*. 2010; 160: 467-479.

Barnes PJ. Corticosteroids: the drug to beat. *European Journal Pharmacology*. 2006; 533: 2-14.

Barnes PJ. Endogenous inhibitory mechanisms in asthma. *American Journal Respiratory and Critical Care Medicine*. 2000; 161: S176–181.

Barnes PJ. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Immunol*. 2008; 8: 183–192.

Barnes PJ. Mechanisms and resistance in glucocorticoid control of inflammation. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2010; 120: 76-85.

Bateman ED, Hurd SS, Barnes PJ, Bousquet J, Drazen JM, FitzGerald M, Gibson P, Ohta K, O'Byrne P, Pedersen SE, Pizzichini E, Sullivan SD, Wenzel SE, Zar HJ. Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary. *Eur Respir J*. 2008; 31: 143-178.

Bates JH, Baconnier P, Milic-Emili J. A theoretical analysis of interrupter technique for measuring respiratory mechanics. *J Appl Physiol*. 1988a, 64: 2204-2214.

Bates JH, Rossi A, Milic-Emili J. Analysis of the behavior of the respiratory system with constant inspiratory flow. *J Appl Physiol*. 1985b, 58: 1840-1848.

Bates JH, Abe T, Romero PV, Sato J. Measurement of alveolar pressure in closed-chest dogs during flow interruption. *J Appl Physiol*. 1989, 67: 488-492.

Bates JH, Decramer M, Chartrand D, Zin WA, Boddener A, Milic-Emili J. Volume-time profile during relaxed expiration in the normal dog. *J Appl Physiol*. 1985a, 59: 732-737.

Bates JH, Ludwig MS, Sly PD, Brown K, Martin JG, Fredberg JJ. Interrupter resistance elucidated by alveolar pressure measurement in open-chest normal dogs. *J Appl Physiol*. 1988b, 65: 408-414.

Beasley R, Pekkanen J, Pearce N. Has the role of atopy in the development of asthma been over-emphasized? *Pediatr Pulmonol*. 2001; 23: 149-150.

Bel EH, Wenzel SE, Thompson PJ, Prazma CM, Keene ON, Yancey SW, Ortega HG, Pavord ID; SIRIUS Investigators. Oral glucocorticoid-sparing effect of mepolizumab in eosinophilic asthma. *N Engl J Med*. 2014, 25: 1189-1197.

Blalock JE. The immune system as a sensory organ. *J Immunol*. 1984; 132: 1067-1070.

Blalock JE. The immune system as the sixth sense. *J Intern Med*. 2005; 257: 126-138.

Bosco A, Ehteshami S, Stern D, Martinez F. Decreased activation of inflammatory networks during acute asthma exacerbations is associated with chronic airflow obstruction. *Mucosal Immunol*. 2010; 3: 399-409,.

Boulet LP, Turcotte H, Laviolette M, Naud F, Bernier MC, Martel S, and Chakir J. Airway hyperresponsiveness, inflammation, and subepithelial collagen deposition in recently diagnosed versus long-standing mild asthma. Influence of inhaled corticosteroids. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000; 162: 1308-1313.

Boulet LP, FitzGerald JM, Levy ML, Cruz AA, Pedersen S, Haahtela T, Bateman ED. A guide to the translation of the Global Initiative for Asthma (GINA) strategy into improved care. *Eur Respir J*. 2012; 39: 1220–1229

Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, Johnson M, Vignola AM. Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000; 161:1720-1745.

Bradding P, Walls AF, Holgate, ST. The role of the mast cell in the pathophysiology of asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2006; 117:1277–1284.

Breivogel CS, Childers SR. The functional neuroanatomy of brain cannabinoid receptors. *Neurobiol Dis*. 1998; 5:417-431.

Brenneisen R. Chemistry and Analysis of Phytocannabinoids and Other British Thoracic Society Guidelines for the management of asthma: a summary. *British Medical Journal*. 1993; 306: 776-782.

Broide DH1, Lawrence T, Doherty T, Cho JY, Miller M, McElwain K, McElwain S, Karin M. Allergen-induced peribronchial fibrosis and mucus production mediated by IkappaB kinase beta-dependent genes in airway epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102(49):17723-8.

Burburan SM, Xisto DG, Ferreira HC, Riva Ddos R, Carvalho GM, Zin WA, Rocco PR. Lung mechanics and histology during sevoflurane anesthesia in a model of chronic allergic asthma. *Anesth Analg*. 2007; 104(3):631-637.

Burchell JT, Wikstrom ME, Stumbles PA, Sly PD, Turner DJ. Attenuation of allergen-induced Airway Hyperresponsiveness is

mediated by airway regulatory T cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2009; 6: L307-L319.

Bush RK. Indoor allergens, environmental avoidance, and allergic respiratory disease. *Allergy Asthma Proc.* 2008; 29: 575-9.

Busse PJ, Zhang TF, Srivastava K, Schofield B, Li XM. Effect of ageing on pulmonary inflammation, airway hyperresponsiveness and T and B cell responses in antigen-sensitized and-challenged mice. *Clin Exp Allergy.* 2007; 37: 1392-1403,.

Busse PJ, Zhang TF, Srivastava K, Schofield B, Li XM. Effect of ageing on pulmonary inflammation, airway hyperresponsiveness and T and B cell responses in antigen-sensitized and-challenged mice. *Clin Exp Allergy.* 2007; 37: 1392-1403,.

Busse W, Banks-Schlegel S, Noel P, Ortega H, Taggart V, Elias J. Future research directions in asthma: an NHLBI Working Group report. *Am J RespirCrit Care Med.* 2004; 15: 683-90.

Busse WW, Lemanske RF Jr. Asthma. *N. Engl. J. Med.* 2001; 344: 350–362.

Campos HS. Mortalidade por asma no Brasil, 1980-98. *Pulmão RJ.* 2004; 4: 208-216.

Carlini EA, Leite JR, Tannhauser M, Berardi AC. Letter: Cannabidiol and *Cannabis sativa* extract protect mice and rats against convulsive agents. *J Pharm Pharmacol.* 1973; 25(8): 664-665.

Carrier EJ; Auchampach JA; Hillard CJ. Inhibition of an equilibrative nucleoside transporter by cannabidiol: a mechanism of cannabinoid immunosuppression. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States American.* 2006; 103: 7895–7900.

Cazzola M & Matera MG. Novel long-acting bronchodilators for COPD and asthma. *Br J Pharmacol*. 2008; 155(3): 291-299.

Chang HK, Mortola JP. Fluid dynamic factors in tracheal pressure measurement. *J Appl Physiol*. 1981; 51:218-225.

Chang HK, Mortola JP. Fluid dynamic factors in tracheal pressure measurement. *J Appl Physiol*. 1981; 51:218-225.

Chatkin MN, Menezes AM, Victora CG, Barros FC. High prevalence of asthma in preschool children in Southern Brazil: a population-based study. *Pediatr Pulmonol*. 2003; 35: 296-301.

Chew AD, Hirota JA, Ellis R, Wattie J, Inman MD, Janssen LJ. Effects of allergen on airway narrowing dynamics as assessed by lung-slice technique. *Eur Respir J*. 2008; 31: 532-538.

Cohn L, Homer RJ, Marinov A, Rankin J, Bottomly K. Induction of airway mucus production by T helper 2 (Th2) cells: a critical role for interleukin 4 in cell recruitment but not mucus production. *J Exp Med*. 1997; 186: 1737–1747.

Corren J. Small airways disease in asthma. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2008; 8(6): 533-539.

Corren J; Lemanske RF; Hanania NA; Korenblat PE; Parsey MV; Arron JR; Harris JM; Scheerens H; Wu LC; SU Z; Mosesova S. Lebrikizumab treatment in adults with asthma. *The New England Journal of Medicine*. 2011; 365: 1088-1098.

Cosmi L, Liotta F, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F. Th17 cells: new players in asthma pathogenesis. *Allergy*. 2011; 66(8): 989-98.

Covar R, Grant E, Hillyer EV, Bacharier L. Natural history of asthma: persistence versus progression-does the beginning predict the end? *J Allergy Clin Immunol*. 2008; 121: 607-613.

Cunha JM, Carlini EA, Pereira AE, Ramos OL, Pimentel C, Gagliardi, R, Sanvito WL, Lander, N, Mechoulam R. Chronic administration of cannabidiol to healthy volunteers and epileptic patients. *Pharmacology*. 1980; 21: 175–185.

DATASUS [Homepage Internet]. Ministerio Da Saúde - Acessado em 10/07/2015, www.datasus.gov.br.

De Backer B, Debrus B, Lebrun P, Theunis L, Dubois N, Decock L, Verstraete A, Hubert P, Charlier C. Innovative development and validation of an HPLC/DAD method for the qualitative and quantitative determination of major cannabinoids in *cannabis* plant material. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2009; 15: 4115-4124.

Detoraki A, Di Capua L, Varricchi G, Genovese A, Marone G, Spadaro G. Omalizumab in patients with eosinophilic granulomatosis with polyangiitis: a 36-month follow-up study. *J Asthma*. 2015; 17: 1-6.

DiGiovanni FA; Ellis R; Wattie J; Hirota JA; Southam DS; Inman MD. Concurrent dual allergen exposure and its effects on airway hyperresponsiveness, inflammation and remodeling in mice. *Disease Models & Mechanisms*. 2009; 2: 275–282.

Doeing DC, Solway J. Airway Smooth Muscle in the Pathophysiology and Treatment of Asthma. *J Appl Physiol*. 2013; 114(7): 834-43.

Doherty T, Broide D. Cytokines and growth factors in airway remodeling in asthma. *Curr Opin Immunol*. 2007; 19(6): 676-80.

Egan RW; Umland SP; Cuss FM; Chapman RW. Biology of interleukin-5 and its relevance to allergic disease. *Allergy*. 1996; 51:71-81.

Egan RW; Athwahl D; Chou CC; Chapman RW; Emtage S; Jenh CH; Kung TT; Mauser PJ; Murgolo NJ; Bodmer MW. Pulmonary biology of anti-interleukin 5 antibodies. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1997; 2: 69-73.

Erzurum SP. Inhibition of tumor necrosis factor α for refractory asthma. *The New England Journal of Medicine*. 2006; 354: 754.

Foster PS; Hogan SP; Matthaei KI; Young IG. Interleukin-4 and interleukin-5 as targets for the inhibition of eosinophilic inflammation and allergic airways hyperreactivity. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1997; 2: 55-61.

Franco R, Nascimento HF, Cruz AA, Santos AC, Souza-Machado C, Ponte EV, et al. The economic impact of severe asthma to low-income families. *Allergy*. 2009; 64(3):478-83.

Fulkerson, PC, Rothenberg, ME, Hogan, SP. Building a better mouse model: experimental models of chronic asthma. *Clin Exp Allergy*. 2005; 35: 1251-1253.

Galiegue S, Mary S, Marchand J, Dussossoy D, Carriere D, Carayon P, Bouaboula M, Shire D, Le Fur G, Casellas P. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur J Biochem*. 1995; 232 : 54-61.

Gauderman WJ, Urman R, Avol E, Berhane K, McConnell R, Rappaport E, Chang R, Lurmann F, Gilliland F. Association of improved air quality with lung development in children. *N Engl J Med*. 2015; 5: 905-913.

Gauvreau GM, Boulet LP, Cockcroft DW, Fitzgerald JM, Carlsten C, Davis BE, Deschesnes F, Duong M, Durn BL, Howie KJ, Hui L, Kasaian MT, Killian KJ, Strinich TX, Watson RM, Y N, Zhou S, Raible D, O'Byrne PM. Effects of interleukin-13 blockade on allergen-induced airway responses in mild atopic asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011; 15: 1007-1014.

GINA – Global Initiative for Asthma [on line]. Ed 2009. United Kingdom. Accessed March, 2014 [Available at <http://www.ginasthma.org>].

GINA – Global Initiative for Asthma [on line]. Ed 2010. United Kingdom. Accessed June 2, 2014 [Available at <http://www.ginasthma.org>].

Girodet PO, Ozier A, Triantafyllidis T, Begueret H, Ousova O, Vernejoux JM, Chanez P, Marthan R, Berger P, and Tunon de Lara JM. Mast cell adhesion to bronchial smooth muscle in asthma specifically depends on CD51 and CD44 variant 6. *Allergy*. 2010; 65: 1004-1012.

Gizycki MJ, Adelroth E, Rogers AV, O'Byrne PM, Jeffery PK. Myofibroblast involvement in the allergen-induced late response in mild atopic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1997; 16: 664–673.

Glass M, Dragunow M, Faull RL. Cannabinoid receptors in the human brain: a detailed anatomical and quantitative autoradiographic study in the fetal, neonatal and adult human brain. *Neuroscience*. 1997; 77: 299-318.

Gu M e Zhao J. Mapping and localization of susceptible genes in asthma. *Chin Med J*. 2011; 124: 132-143.

Haldar P, Brightling CE, Hargadon B, Gupta S, Monteiro W, Sousa A, Marshall RP, Bradding P, Green RH, Wardlaw AJ, Pavord ID. Mepolizumab and exacerbations of refractory eosinophilic asthma. *N Engl J Med*. 2009; 360: 973-984.

Hammad H & Lambrecht BN. Recent progress in the biology of airway dendritic cells and implications for understanding the regulation of asthmatic inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2006; 118: 331-336.

Hanania NA, Noonan M, Corren J, Korenblat P, Zheng Y, Fischer SK, Cheu M, Putnam WS, Murray E, Scheerens H, Holweg CT, Maciucă R, Gray S, Doyle R, McClintock D, Olsson J, Matthews JG, Yen K. Lebrikizumab in moderate-to severe asthma pooled data from two randomized placebo-controlled studies. *Thorax*. 2015; 70:748-56.

Hargreave FE, Nair P. The definition and diagnosis of asthma. *ClinExp Allergy*. 2009; 39: 1652-1658;.

Hashimoto-dani Y1, Ohno-Shosaku T, Kano M. Endocannabinoids and synaptic function in the CNS. *Neuroscientist*. 2007, 13(2):127-37.

Hassanzadeh P, Rostami F. CB1 cannabinoid receptors are involved in neuroleptic-induced enhancement of brain neurotensin. *Iran J Basic Med Sci*. 2014; 17(3):181-8.

Hayashi T, Gong X, Rossetto C, Shen C, Takabayashi K, Redecke V, Spiegelberg H, Broide D, Raz E. Induction and inhibition of the Th2 phenotype spread: implications for childhood asthma. *J Immunol*. 2005; 174: 5864-5873,.

He S, Walls AF. Human mast cell tryptase: A stimulus of microvascular leakage and mast cell activation. *Eur J Pharmacol.* 1997; 328: 89–97.

Hegde VL¹, Nagarkatti PS, Nagarkatti M. Role of myeloid-derived suppressor cells in amelioration of experimental autoimmune hepatitis following activation of TRPV1 receptors by cannabidiol. *PLoS One.* 2011; 4: 18-28.

Herkenham M, Lynn AB, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, Rice KC ; Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J Neurosci.* 1991; 11: 563-583.

Holgate ST. A Brief History of Asthma and Its Mechanisms to Modern Concepts of Disease Pathogenesis. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2010; 2:165-171.

Holloway JW, Yang IA, Holgate ST. Genetics for Allergic Diseases. *J Allergy Clin Immunol.* 2010; 125: 81-94.

Honório KM, de Lima EF, Quiles MG, Romero RA, Molfetta FA, da Silva AB. Artificial neural networks and the study of the psychoactivity of cannabinoid compounds. *Chem Biol Drug Des.* 2010, 75(6):632-40.

Horner AA. Regulation of aeroallergen immunity by the innate immune system: laboratory evidence for a new paradigm. *J Innate Immun.* 2010; 2: 107-113.

Hoshino T, Toda R, Aizawa H. Pharmacological treatment in Asthma and COPD. *Allergology international: of the Japanese Society of Allergology.* 2009; 58: 341-346.

Howlett AC e cols. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev.* 2002; 54(2):

161-202.

Huber HL, Koessler KK. The pathology of fatal asthma. Arch Intern Med 1922; 30: 689-760.

Hughes SE, Hall PA. Overview of the fibroblast growth factor and receptor families: complexity, functional diversity, and implications for future cardiovascular research. Cardiovasc Res. 2003; 27: 1199–1203.

Humbert M; Durham SR; Ying S; Kimmitt P; Barkans J; Assoufi B; Pfister R; Menz G; Robinson DS; Kay AB; Corrigan CJ. IL-4 and IL-5 mRNA and protein in bronchial biopsies from patients with atopic and nonatopic asthma: evidence against "intrinsic" asthma being a distinct immunopathologic entity. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 1996; 154:1497-504.

Hyde DM, Hamid Q, Irvin CG. Anatomy, pathology, and physiology of the tracheobronchial tree: emphasis on the distal airways. J Allergy Clin Immunol. 2009; 124: S72-7. Review.

ISAAC - The International Study of Asthma and Allergy in Childhood, Steering Committee. Worldwide variation in prevalence of asthma symptoms. Eur Respir J. 1998; 12:315-335.

Iuvone, T, Esposito G, Esposito R, Santamaria R, Di Rosa M, Izzo, AA., Neuroprotective effect of cannabidiol, a non-psychoactive component from *Cannabis sativa*, on beta-amyloid-induced toxicity in PC12 cells. J. Neurochem. 2004; 89: 134–141.

Izzo AA; Borrelli F; Capasso R; DI Marzo V; Mechoulam R. Non-psychoactive plant cannabinoids: new therapeutic opportunities from an ancient herb. Trends in Pharmacological Sciences. 2009; 30: 515–527.

James A, Carroll N. Airway smooth muscle in health and disease; methods of measurement and relation to function. *Eur Respir J* 2000; 15: 782–9.

James A. 2005 Remodelling of airway smooth muscle in asthma: what sort do you have? *ClinExp Allergy*. 2005, 35: 703–7.

Jardim JR. Pharmacological Economics And Asthma Treatment. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 2007; 33: 4-6.

Johnson SR, Knox AJ. Synthetic functions of airway smooth muscle in asthma. *Trends Pharmacol Sci*. 1997; 18: 288-292.

Kariyawasam HH & Robinson DS. The eosinophil: the cell and its weapons, the cytokines, its locations. *Semin Respir Crit Care Med*. 2006; 27: 117–127.

Karniol IG, Carlini EA. Pharmacological interaction between cannabidiol and delta 9-tetrahydrocannabinol. *Psychopharmacologia*. 1973; 1: 53-70.

Katrin P, Dorothee S, Michael W, Samuel H, Steffen S, Alexander Q, Joachim H. M, Susetta F, Ansgar WL, Manfred B, Christoph S. Coexpression of TGF- β 1 and IL-10 Enables Regulatory T Cells to Completely Suppress Airway Hyperreactivity. *J Immunol*. 2008; 181(11): 7751-7758.

Kaur D, Saunders R, Berger P, Siddiqui S, Woodman L, Wardlaw A, Bradding P, Brightling CE. Airway smooth muscle and mast cell derived CC chemokine ligand 19 mediate airway smooth muscle migration in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006, 174: 1179-1188.

Kay AB. The role of eosinophils in the pathogenesis of asthma. *Trends Mol Med*. 2005; 11: 148–152.

Kim SH, Ye YM, Lee HY, Sin HJ, Park HS. Combined pharmacogenetic effect of ADCY9 and ADRB2 gene polymorphisms on the bronchodilator response to inhaled combination therapy. *J Clin Pharm Ther.* 2011; 36(3): 399-405.

Kips, JC. Anderson GP, Fredberg JJ, Herz U, Inman MD, Jordana M, Kemeny DM, Lötvall J, Pauwels RA, Plopper CG, Schmidt D, Sterk PJ, Van Oosterhout AJ, Vargaftig BB, Chung KF. Murine models of asthma. *Eur Respir J.* 2003; 22: 374-382.

Kitamura K, Takeda K, Koya T. et al. Critical role of the Fc receptor [1]-chain on APCs in the development of allergen-induced airway hyperresponsiveness and inflammation. *J Immunol.* 2007; 178: 480-488.

Klein TW, Newton C, Friedman H. Cannabinoid receptors and immunity. *Immunol Today.* 1998; 9: 373-381.

Klein TW, Newton C, Larsen K, Lu L, Perkins I, Nong L, Friedman H. The cannabinoid system and immune modulation. *J Leukoc Biol.* 2003; 74: 486-496.

Ko FW, Diba C, Roth M, McKay K, Johnson PR, Salome C, King GG. A comparison of airway and serum matrix metalloproteinase-9 activity among normal subjects, asthmatic patients, and patients with asthmatic mucus hypersecretion. *Chest.* 2005; 127: 1919-1927.

Kochi T, Okubo S, Zin WA, Milic-Emili J. Chest wall and respiratory system mechanics in cats: effects on flow and volume. *J Appl Physiol.* 1988b; 64: 2636-2646.

Kochi T, Okubo S, Zin WA, Milic-Emili J. Flow and volume dependence of pulmonary mechanics in anesthetized cats. *J Appl Physiol.* 1988a; 64: 441-450.

Kotsimbos TC; Ernst P; Hamid QA. Interleukin-13 and interleukin-4 are coexpressed in atopic asthma. *Proceedings of the Association Physicians*. 1996; 108: 368-373.

Krug N, Hohlfeld JM, Kirsten AM, Kornmann O, Beeh KM, Kappeler D, Korn S, Ignatenko S, Timmer W, Rogon C, Zeitvogel J, Zhang N, Bille J, Homburg U, Turowska A, Bachert C, Werfel T, Buhl R, Renz J, Garn H, Renz H. Allergen-induced asthmatic responses modified by a GATA3-specific DNase. *N Engl J Med*. 2015; 21: 1987-1995.

Kuperman DA; Huang X; Koth LL; Chang GH; Dolganov GM; Zhu Z; Elias JA; Sheppard D; Erle DJ. Direct effects of interleukin-13 on epithelial cells cause airway hyperreactivity and mucus overproduction in asthma. *Nature Medicine*. 2002; 8: 885-889.

Lacy P, Moqbel R. Immune effectors functions of eosinophils in allergic airway inflammation. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2001; 1: 79.

Lacy P; Moqbel R. Eosinophils: synthesis, storage and release from human eosinophils. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1997; 92: 125-133.

Lalani T; Simons RK; Ahmed AR. Biology of IL-5 in health and disease. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*. 1999; 82:317-332.

Lemiere C, Ernst P, Olivenstein, Yamauchi Y, Govindaraju K, Ludwig MS, Martin JG, Hamid Q. Airway inflammation assessed by invasive and noninvasive means in severe asthma: eosinophilic and noneosinophilic phenotypes. *J Allergy Clin Immunol*. 2006; 118: 1033–1039.

Li Z, Zhang Y, Sun B. Current understanding of Th2 cell differentiation and function. *Protein Cell*. 2011; 8: 604-11.

Mailleux P, Vanderhaeghen JJ. Localization of cannabinoid receptor in the human developing and adult basal ganglia. Higher levels in the striatonigral neurons. *Neurosci Lett*. 1992; 148: 173-176.

Mansouri S, Ojha S, Al Maamari E, Al Ameri M, Nurulain SM, Bahi A. The cannabinoid receptor 2 agonist, β -caryophyllene, reduced voluntary alcohol intake and attenuated ethanol-induced place preference and sensitivity in mice. *Pharmacol Biochem Behav*. 2014; 124: 260-268.

Martinez FD. CD14, Endotoxin, and asthma risk: actions and interactions. *Proc Am Thorac Soc*. 2007, 4: 221- 225.

Matsumoto K, Inoue H, Fukuyam S. Frequency of Foxp3+CD4CD25+ T cells is associated with the phenotypes of allergic asthma. *Respirology*. 2009; 14:187–194.

Mayuzumi H, Ohki Y, Tokuyama K, Sato A, Mizuno T, Arakawa H, Mochizuki H, Morikawa A. Age-related difference in the persistency of allergic airway inflammation and bronchial hyperresponsiveness in a murine model of asthma. *Int Arch Allergy Immunol*. 2007; 143: 255-262.

Mechoulam R; Parker LA; Gallily R. Cannabidiol: an overview of some pharmacological aspects. *Journal of Clinical Pharmacology*. 2002; 42: 11S–19S.

Michoulam R, Shvo Y. Hashish. I. The structure of cannabidiol. *Tetrahedron*. 1963; 19: 2073-2078.

Miller M, Cho JY, McElwain K, McElwain S, Shim JY, Manni M, Baek JS, Broide DH. Corticosteroids prevent myofibroblast

accumulation and airway remodeling in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006; 290: L162–L169.

Ministerio da Saúde – [Homepage Internet] Acessado em 11/01/2016, www.brasil.gov.br/saude/2015/01/asma-atinge-6-4-milhoes-de-brasileiros

Moeller A, Gilpin SE, Ask K, Cox G, Cook D, Gauldie J, Margetts PJ, Farkas L, Dobranowski J, Boylan C, O’Byrne P, Strieter RM and Kolb M. Circulating Fibrocytes Are an Indicator of Poor Prognosis in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Critical Care Med*. 2009; 179: 588-594.

Montes, GS. Structural biology of the fibres of the collagenous and elastic systems. *Cell Biology International*. 1996; 20: 15-27.

Morishima Y, Nomura A, Uchida Y, Noguchi Y, Sakamoto T, Ishii Y, Goto Y, Musuyama K, Zhang MJ, Hirano K. Triggering the induction of myofibroblasts and fibrogenesis by airway epithelial shedding. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2001; 24(1): 1-11.

Mortola JP, Noworaj JA. Two-sidearm tracheal cannula for respiratory airflow measurements in small animals. *J Appl Physiol*. 1993; 55: 250-253.

Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar, M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*. 1993; 365 : 61-65.

Naftali T, Mechulam R, Lev LB, Konikoff FM. *Cannabis* for inflammatory bowel disease. *Dig Dis*. 2014; 32(4): 468-74.

Nakanishi K. Basophils are potent antigen-presenting cells that selectively induce Th2 cells. *Eur J Immunol.* 2010; 40 (7): 1836-1842.

National Heart, Lung and Blood Institute. New NHLBI guidelines for the diagnosis and management of asthma. *Lippincott HealthPromotLett.* 1997; 2: 8-9.

Ohno I, Nitta Y, Yamauchi K, Hoshi H, Honma M, Woolley K, O'Byrne P, Tamura G, Jordana M, Shirato K. Transforming growth factor α_1 (TGF α_1) gene expression by eosinophils in asthmatic airway inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1996; 15: 404-409.

Ortega HG, Liu MC, Pavord ID, Brusselle GG, FitzGerald JM, Chetta A, Humbert M, Katz LE, Keene ON, Yancey SW, Chanez P; MENSA Investigators. Mepolizumab treatment in patients with severe eosinophilic asthma. *N Engl J Med.* 2014; 25: 371: 1198-1207.

Papierniak ES, Lowenthal DT, Harman E. Novel therapies in asthma: leukotriene antagonists, biologic agents, and beyond. *Am J Ther.* 2013; 20(1): 79-103.

Park SW; Verhaeghe C; Nguyenvu LT; Barbeau R; Eisley CJ; Nakagami Y; Huang X; Woodruff PG; FAHY JV; Erle DJ. Distinct roles of FOXA2 and FOXA3 in allergic airway disease and asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.* 2009; 180: 603–610.

Pearce N. Pekkanen J, Beasley R. How much asthma is really attributable to atopy? *Thorax.* 1999; 54: 268–272.

Pelaia G, Vatrella A, Maselli R. The potential of biologics for the treatment of asthma. *Nat Rev Drug Discov*. 2012; 12: 958-972.

Pertwee RG. The pharmacology and therapeutic potential of cannabidiol. *Cannabinoids*. Kluwer Academic/Plenum Publishers. 2004; 5: 32-83.

Pincus SH, Ramesh KS, Wyler DJ. Eosinophils stimulate fibroblast DNA synthesis. *Blood*. 1987; 70: 572-574.

Piomelli D. The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci*. 2003; 4: 873-84.

Ponte E, Franco RA, Souza-Machado C, Cruz AA. Impacto De Um Programa Para O Controle Da Asma Grave Na Utilização De Recursos Do Sistema Único De Saúde *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 2007; 33: 15-19.

Radwan MM1, Elsohly MA, Slade D, Ahmed SA, Wilson L, El-Alfy AT, Khan IA, Ross SA. Non-cannabinoid constituents from a high potency *Cannabis sativa* variety. *Phytochemistry*. 2008; 69: 2627-2633.

Rahaman SO, Grove LM, Paruchuri S, Southern BD, Abraham S, Niese KA, Scheraga RG, Ghosh S, Thodeti CK, Zhang DX, Moran MM, Schilling WP, Tschumperlin DJ, Olman MA. TRPV4 mediates myofibroblast differentiation and pulmonary fibrosis in mice. *J Clin Invest*. 2014; 124: 5225-5238.

Ribatti D1, Marimpietri D, Pastorino F, Brignole C, Nico B, Vacca A, Ponzoni M. Angiogenesis in neuroblastoma. *Ann N Y Acad Sci*. 2004; 1028:133-142.

Ribeiro A, Almeida VI, Costola-de-Souza C, Ferraz-de-Paula V, Pinheiro ML, Vitoretto LB, Gimenes-Junior JA, Akamine AT, Crippa JA, Tavares-de-Lima W, Palermo-Neto J. Cannabidiol improves lung function and inflammation in mice submitted to LPS-induced acute lung injury. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2015; 37: 35-41.

Reddel HK, Bateman ED, Becker A, Boulet LP, Cruz AA, Drazen JM, Haahtela T, Hurd SS, Inoue H, de Jongste JC, Lemanske RF Jr, Levy ML, O'Byrne PM, Paggiaro P, Pedersen SE, Pizzichini E, Soto-Quiroz M, Szeffler SJ, Wong GW, FitzGerald JM. A summary of the new GINA strategy: a roadmap to asthma control. *Eur Respir J*. 2015; 46: 622-639.

Ribeiro A, Ferraz-de-Paula V, Pinheiro ML, Vitoretto LB, Mariano-Souza DP, Quinteiro-Filho WM, Akamine AT, Almeida VI, Quevedo J, Dal-Pizzol F, Hallak JE, Zuardi AW, Crippa JA, Palermo-Neto J. Cannabidiol, a non-psychoactive plant-derived cannabinoid, decreases inflammation in a murine model of acute lung injury: role for the adenosine A(2A) receptor. *Eur J Pharmacol*. 2012; 5: 678: 78-85.

Robinson DS, Hamid Q, Ying S, Tsicopoulos A, Barkans J, Bentley AM, Corrigan C, Durham SR, Kay AB. Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med*. 1992; 326: 298-304.

Rodrigo GJ, Neffen, H & Castro-Rodriguez JA. Efficacy and safety of subcutaneous omalizumab versus placebo as add-on therapy to corticosteroids for children and adults with asthma: a systematic review. *Chest*. 2011; 139: 28-35.

Rodríguez de Fonseca FI, Del Arco I, Bermudez-Silva FJ, Bilbao A, Cippitelli A, Navarro M The endocannabinoid system: physiology and pharmacology. *Alcohol Alcohol.* 2005; 40: 2-14.

Rosenkrantz H, Fleischman RW, Grant RJ. Toxicity of short-term administration of cannabinoids to rhesus monkeys. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1981; 58: 118-131.

Sakae RS, Leme AS, Dolhnikoff M, Pereira PM, do Patrocínio M, Warth TN, Zin WA, Saldiva PH, Martins MA. Neonatal capsaicin treatment decreases airway and pulmonary tissue responsiveness to methacoline. *Am J Physiol.* 1994; 266: 23-29.

Saldiva PH, Zin WA, Santos RL, Eidelman DH, Milic-Emili J. Alveolar pressure measurement in open-chest rats. *J Appl Physiol.* 1992; 72: 302-306.

Sallmann, E. et al. High-affinity IgE receptors on dendritic cells exacerbate TH2-dependent inflammation. *J. Immunol.* 2011; 187: 164–171.

Samitas K, Rådinger M, Bossios A. Current update on eosinophilic lung diseases and anti-IL-5 treatment. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov.* 2011; 6: 189-205.

Saunders R, Siddiqui S, Kaur D, Doe C, Sutcliffe A, Hollins F, Bradding P, Wardlaw A, Brightling CE. Fibrocyte localization to the airway smooth muscle is a feature of asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2009; 123(2): 376-384.

Schatz AR, Lee M, Condie RB, Pulaski JT, Kaminski NE. Cannabinoid receptors CB1 and CB2: a characterization of expression

and adenylate cyclase modulation within the immune system. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1997; 142: 278-287.

Schmidt M, Sun G, Stacey MA, Mori L, Mattoli S. Identification of Circulating Fibrocytes as Precursors of Bronchial Myofibroblasts in Asthma. *J Immunol.* 2003; 170: 380–389.

Schweitzer AN, Borriello F, Wong RC, Abbas AK, Sharpe AH. Role of costimulators in T cell differentiation: Studies using antigen-presenting cells lacking expression of CD80 or CD86. *J Immunol.* 1997; 158: 2713-2722.

Schwingshacki A; Duszyk M; Bravn N; Moqbel R. Human eosinophis release matrix metalloproteinase-9 on stimulation with TNFalpha. *The Journal of Allergy Clinical Immunology.* 1999; 104: 983.

Sehmi R, Baatjes AJ, Denburg JA. Hemopoietic progenitor cells and hemopoietic factors: potential targets for treatment of allergic inflammatory diseases. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 2003; 2(4): 271-278.

Siddiqui S, Morris J, Avery N, Wyand S, Rood D, Silbart LK. Pulmonary eosinophilia correlates with allergen deposition to the lower respiratory tract in a mouse model of asthma. *Clin Exp Allergy.* 2008; 38: 1381-1390.

Silva P, Rosa AM, Hacon SS, Ignotti E. Hospitalização de crianças por asma na Amazônia brasileira: tendência e distribuição espacial. *J. Pediatr.* 2009; 85.

Silva PL, Passaro CP, Cagido VR, Bozza M, Dolhnikoff M, Negri EM, Morales MM, Capelozzi VL, Zin WA, Rocco PR. Impact of lung

remodelling on respiratory mechanics in a model of severe allergic inflammation. *Respir Physiol Neurobiol.* 2008; 160: 239-248.

Singh D, Petavy F, Macdonald AJ, Lazaar AL, O Connor BJ. The inhaled phosphodiesterase 4 inhibitor GSK256066 reduces allergen challenge responses in asthma. *Respir Res.* 2010; 11: 26.

Solé D; Wandalsen GF; Camelo-Nunes IC; Naspitz CK; ISAAC - Brazilian Group. Prevalence Of Symptoms Of Asthma, Rhinitis, And Atopic Eczema Among Brazilian Children And Adolescents Identified By The International Study Of Asthma And Allergies In Childhood (Isaac) - Phase 3. *Jornal de Pediatria.* 2006; 82: 341-346.

Souza-Machado C, Souza-Machado A, Franco R, Ponte EV, Barreto ML, Rodrigues LC, et al. Rapid reduction in hospitalisations after an intervention to manage severe asthma. *Eur Respir J.* 2010; 35(3): 515-521.

Strachan DP. Family size, infection and atopy: the first decade of the 'hygiene hypothesis'. *Thorax.* 2000; 55 (1): S2-S10.

Stumbles PA, Thomas JA, Pimm CL, Lee PT, Venaille TJ, Proksch S, Holt PG. Resting respiratory tract dendritic cells preferentially stimulate T helper cell type 2 (Th2) responses and require obligatory cytokine signals for induction of Th1 immunity. *J Exp Med.* 1998; 188: 2019-2031.

Sumi Y, Hamid Q. Airway remodeling in asthma. *Allergol Int.* 2007; 56: 341-348.

Tae YM; Park HT; Moon HG; Kim YS; Jeon SG; Roh TY; Bae YS; Gho YS; Ryu SH; Kwon HS; Kim YK. Airway activation of formyl peptide receptors inhibits Th1 and Th17 cell responses via inhibition of

mediator release from immune and inflammatory cells and maturation of dendritic cells. *Journal of Immunology*. 2012; 15: 1799-1808.

Tagaya E1, Tamaoki J. Mechanisms of airway remodeling in asthma. *Allergol Int*. 2007; 56: 331-40.

Teerlink CC, Camp NJ, Bansal A, Crapo R, Hughes D, Kort E, Rowe K, Cannon-Albright LA. Significant evidence for linkage to chromosome 5q13 in a genome-wide scan for asthma in an extended pedigree resource. *Eur J Hum Genet*. 2009; 17: 636-643.

Thakur GA, Duclos JR RI, Makriyannis A. Natural cannabinoids: Templates for drug discovery. *Life Science*. 2005; 78: 454-466.

Thomson NC¹, Chaudhuri R, Spears M. Emerging therapies for severe asthma. *BMC Med*. 2011; 6: 109-102.

Tulic MK, Hamid Q. Contribution of the distal lung to the pathologic and physiologic changes in asthma: potential therapeutic target Roger S. Mitchell lecture. *Chest*. 2003; 123: 348-355.

Uhm TG, Kim BS, Chung IY. Eosinophil development, regulation of eosinophil-specific genes, and role of eosinophils in the pathogenesis of asthma. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2012; 4(2): 68-79.

Upham JW, Stumbles PA. Why are dendritic cells important in allergic diseases of the respiratory tract? *Pharmacol Ther*. 2003; 100: 75-87.

Van Snick J. Interleukin-6:an overview. *Annual Review of Immunology*. 1990; 8: 253.

Vermeer PD, Harson R, Einwalter LA, Moninger T, Zabner J. Interleukin-9 induces goblet cell hyperplasia during repair of human airway epithelia. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2003; 28: 286-295.

Vieira RP, Claudino RC, Duarte AC, Perini A, Santos AB, Moriya HT, Arantes-Costa FM, Martins MA, Carvalho CR, Dolhnikoff M. Creatine supplementation exacerbates allergic lung inflammation and remodeling in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2007a; 37: 660-667.

Vieira RP, Claudino RC, Duarte AC, Santos AB, Perini A, Faria Neto HC, Mauad T, Martins MA, Dolhnikoff M, Carvalho CR. Aerobic exercise decreases chronic allergic lung inflammation and airway remodeling in mice. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007b; 176: 1-7.

Vignola AM, Mirabella F, Costanzo G, Di Giorgi R, Gjomarkaj M, Bellia V, Bonsignore, G. Airway remodeling in asthma. *Chest*. 2003; 123:417-422.

Walsh GM. An update on emerging drugs for asthma. *Expert Opin Emerg Drugs*. 2012; 17: 37-42.

Wang C-H, Huang CD, Lin HC, Lee KY, Lin SM, Liu CY, et al. Increased circulating fibrocytes in asthma with chronic airflow obstruction. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008; 178: 583-591.

Weibel, E.R. Morphometry: stereological theory and practical methods. In: Gil J, editor. *Models of Lung Disease-Microscopy and Structural Methods*. New York: Marcel Dekker. 1990; 199-247.

Weiss ST, Raby BA, Rogers A. Asthma genetics and genomics 2009. *Curr Opin Genet Dev*. 2009; 19: 279-282.

Wenzel S, Ford L, Pearlman D, Spector S, Sher L, Skobieranda F, Wang L, Kirkesseli S, Rocklin R, Bock B, Hamilton J, Ming JE, Radin

A, Stahl N, Yancopoulos GD, Graham N, Pirozzi G. Dupilumab in persistent asthma with elevated eosinophil levels. *N Engl J Med*. 2013; 368: 2455-2466.

Wenzel SE, Busse WW. Severe asthma: Lessons from the Severe Asthma Research Program. *J Allergy Clin Immunol*. 2007; 119(1):14–21.

Wheal AJ, Cipriano M, Fowler CJ, Randall MD, O'Sullivan SE. Cannabidiol improves vasorelaxation in Zucker diabetic fatty rats through cyclooxygenase activation. *J Pharmacol Exp Ther*. 2014, 351(2): 457-466

Wills-Karp M; Luyimbazi J; XU X; Schofield B; Neben TY; Karp CL; Donaldson DD. Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. *Science*. 1998; 282: 2258-2261.

Wilson DH, Adams RJ, Tucker G, Appleton S, Taylor AW, Ruffin RE. Trends in asthma prevalence and population changes in South Australia, 1990– 2003. *Med J Aust*. 2006; 184: 226-229.

Woodruff PG, Khashayar R, Lazarus SC, Janson S, Avila P, Boushey HA, Segal M, Fahy JV. Relationship between airway inflammation, hyperresponsiveness, and obstruction in asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2001; 108: 753-758.

Xisto DG, Farias LL, Ferreira HC, Picanço MR, Amitrano D, Lapa e Silva JR, Negri EM, Mauad T, Carnielli, Silva FF, Capelozzi VL, Faffe DS, Zin WA, Rocco PRM. Lung Parenchyma Remodeling in a Murine Model of Chronic Allergic Inflammation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005; 171: 829–837.

Ying S; Robinson DS; Meng Q; Rottman J; Kennedy R; Ringler DJ; Mackay CR; Daugherty BL; Springer MS; Durham SR; Williams TJ; Kay AB. Enhanced expression of eotaxin and CCR3 mRNA and protein in atopic asthma. Association with airway hyperresponsiveness and predominant co-localization of eotaxin mRNA to bronchial epithelial and endothelial cells. *European Journal of Immunology*. 1997; 27: 3507-3516.

Zanini A1, Chetta A, Imperatori AS, Spanevello A, Olivieri D. The role of the bronchial microvasculature in the airway remodelling in asthma and COPD. *Respir Res*. 2010; 29: 111:132.

Zhornitsky S, Potvin S. Cannabidiol in humans-the quest for therapeutic targets. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2012; 21, 529-552.

Zhou S, Potts EN, Cuttitta F, Foster WM, Sunday ME. Gastrin-releasing peptide blockade as a broad-spectrum anti-inflammatory therapy for asthma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011; 108: 2100-2105

Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Annu Rev Immunol*. 2010; 28: 445-489.

Zhu Z, Homer RJ, Wang Z, Chen Q, Geba GP, Wang J, Zhang Y, Elias JA. Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production. *The Journal of Clinical Investigation*. 1999; 103: 779-788.

Zietkowski Z, Tomasiak MM, Skiecko R, Bodzenta-Lukaszyk A. RANTES in exhaled breath condensate of stable and unstable asthma patients. *Respir Med*. 2008; 102: 1198-202.

Zosky GR, Sly PD. Animal models of asthma. *Clin Exp Allergy*. 2007; 37: 973-988.

Zuardi AW. Cannabidiol: from an inactive cannabinoid to a drug with wide spectrum of action. Rev Bras Psiquiatr. 2008; 30: 271–280.

Zuardi, A.W., Crippa, J.A., Hallak, J.E., Moreira, F.A., Guimarães, F.S. Cannabidiol, a *Cannabis sativa* constituent, as an antipsychotic drug. Braz. J. Med. Biol. Res. 2006; 39, 421–429.